(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12)特　許　公　報（Ｂ２）　(11)特許番号

特許第5752355号

（Ｐ５７５２３５５）

(45)発行日　平成27年7月22日(2015.7.22)　(24)登録日　平成27年5月29日(2015.5.29)

(51)Int.Cl.　　Ｆ Ｉ

*Ｃ１２Ｎ　15/09　(2006.01)*　　Ｃ１２Ｎ　15/00　ＺＮＡＡ

*Ａ０１Ｋ　67/027　(2006.01)*　　Ａ０１Ｋ　67/027

請求項の数21　（全74頁）

(21)出願番号　特願2009-537748(P2009-537748)
(86)(22)出願日　平成19年11月23日(2007.11.23)
(65)公表番号　特表2010-510773(P2010-510773A)
(43)公表日　平成22年4月8日(2010.4.8)
(86)国際出願番号　PCT/IB2007/054770
(87)国際公開番号　WO2008/062383
(87)国際公開日　平成20年5月29日(2008.5.29)
審査請求日　平成22年11月22日(2010.11.22)
審判番号　不服2014-6612(P2014-6612/J1)
審判請求日　平成26年4月10日(2014.4.10)
(31)優先権主張番号　P0600870
(32)優先日　平成18年11月24日(2006.11.24)
(33)優先権主張国　ハンガリー(HU)
(31)優先権主張番号　P0700534
(32)優先日　平成19年8月14日(2007.8.14)
(33)優先権主張国　ハンガリー(HU)

(73)特許権者　509144225
ナショナル　アグリカルチュラル　リサーチ　アンド　イノベーション　センター
ハンガリー国　マジャールオルサーグ　ペスト　２１００　ゲデレー　セント－ジョルジュ　アルベルト　ウッツァ．４．
(73)特許権者　509144236
エトヴェシュ　ロラーンド　ユニバーシティ
ハンガリー国　Ｈ－１０５３　ブダペスト　エジュテム　テール　１－３．
(74)代理人　100107515
弁理士　廣田　浩一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】トランスジェニック（Ｔｇ）非ヒト動物における体液性免疫応答を向上させる方法



(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
トランスジェニック（Ｔｇ）非ヒト動物において、同一種の非トランスジェニック対照動物に比べて、抗原に対する体液性免疫応答を向上させる方法であって、
向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記非ヒト動物に導入し、前記抗原を前記動物に投与することを含み、
前記遺伝子構築物がＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする核酸配列の発現を提供し、
前記体液性免疫応答の向上が、抗原特異的なＢ細胞のクローンの増殖の向上を含むことを特徴とする方法。
【請求項２】
体液性免疫応答の向上が、抗原による免疫感作時の免疫グロブリン産生レベルを向上させることを含み、前記免疫グロブリンに特異的な親和性を有するＦｃＲｎが前記免疫感作時に前記動物によって産生される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】



体液性免疫応答の向上が、好中球の二次リンパ器官への流入を刺激することを含む、請求項１から２のいずれかに記載の方法。
【請求項４】
体液性免疫応答の向上が、樹状細胞及びマクロファージの少なくともいずれかの二次リンパ器官への流入を刺激することを含む、請求項１から２のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
二次リンパ器官が脾臓を含む、請求項３から４のいずれかに記載の方法。
【請求項６】
抗原が弱免疫原である、請求項１から５のいずれかに記載の方法。
【請求項７】
Ｔｇ非ヒト動物が哺乳動物である、請求項１から６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
哺乳動物がげっ歯類である、請求項７に記載の方法。

【請求項９】
げっ歯類がマウスである、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
哺乳動物がウサギである、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
哺乳動物がウシ、ブタ、ラクダ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ロバ及びウマからなる群から選択される、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
哺乳動物が、モノクローナル抗体産生に有用な系統及びモノクローナル抗体産生により適するように遺伝子的に改変された系統のいずれかから得られる、請求項７から１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
哺乳動物が、ポリクローナル抗体産生に有用な系統又はポリクローナル抗体産生により適するように遺伝子的に改変された系統から得られる、請求項７から１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１４】
体液性免疫応答の向上が、抗原による免疫感作時の免疫グロブリン産生レベルを向上させることを含み、前記免疫グロブリンがＩｇＧである、請求項１から１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１５】
体液性免疫応答の向上が、抗原による免疫感作時の免疫グロブリン産生レベルを向上させることを含み、前記免疫グロブリンがＩｇＭである、請求項１から１３のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
Ｔｇ非ヒト動物がヒト又はヒト化免疫グロブリンの産生のために形質転換されている、請求項１から１５のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
ＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする核酸配列が突然変異している、請求項１から１６のいずれかに記載の方法。
【請求項１８】
突然変異によりＦｃＲｎタンパク質のアルブミン結合部位の機能が失われる、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
核酸配列がキメラＦｃＲｎタンパク質をコードする、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
向上したＦｃＲｎ活性が、ＦｃＲｎをコードする核酸配列の一個より大の機能的コピーを動物のゲノムに組み込むことにより提供される、請求項１から１９のいずれかに記載の方法。
【請求項２１】
遺伝子構築物がＢＡＣクローン＃１２８Ｅ０４のウシのインサート及びＢＡＣクローン＃２６２Ｅ０２のウサギのインサートのいずれかを含む、請求項１から２０のいずれかに記載の方法。



【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は免疫学分野に関する。より詳細には、本発明は、同一種の非トランスジェニック対照動物に比べて、抗原に対して向上した体液性免疫応答を発現することができるトランスジェニック（Ｔｇ）非ヒト動物の作製方法であって、向上したMHCクラスＩ関連新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）活性を提供する遺伝子構築物を前記非ヒト動物に導入することを含む作製方法を提供する。本発明はまた、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ非ヒト動物及びこれら動物の非治療的方法における使用を提供する。本発明はまた、治療用遺伝子構築物及び治療方法を提供する。更に本発明は免疫グロブリンの製造方法を提供する。
【背景技術】
【０００２】
抗原応答に際しては、Ｂリンパ球は形質細胞となり、抗原による攻撃から約１～２週間でピークに達する特異的体液性免疫反応に至る。抗原との２度目の遭遇の際には、該抗原に対する親和性が向上した抗体が分泌され、特異的血清抗体価のピークが上昇し、更に血清中の抗体レベルは持続性のあるものとなる。特異的血清抗体レベルの維持には、形質細胞による継続的なＩｇ分泌が必要であると共に、これらの早期排出を防ぐ必要がある。ＩｇＭ、ＩｇＡ及びＩｇＥが比較的早く体内から排出されるのに対して、ＩｇＧの血清中の半減期は長い。１９５８年、Ｂｒａｍｂｅｌｌは母性ＩｇＧの輸送を仲介する可飽和受容体系（ｓａｔｕｒａｂｌｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｓｙｓｔｅｍ）について述べ（非特許文献１）、更に、ＩｇＧを異化作用から保護することによりその寿命を全血漿タンパク質の中で最も長いものとする、同様又は同一の受容体が存在することを予測した（非特許文献２）。結局、このＢｒａｍｂｅｌｌ受容体（ＦｃＲＢ）は、出産前及び／又は新生児期におけるＩｇＧの伝達を仲介する（この場合はＦｃＲｎ（新生児型Ｆｃ受容体）と称される）と共に、ＩｇＧの異化作用からの保護も仲介することが示された（非特許文献３）。
【０００３】
ＦｃＲｎは、新生児の腸を介して母体から新生児に母性免疫グロブリンを伝達する受容体として、げっ歯類で初めて同定された（非特許文献４及び５）。ＳｉｍｉｓｔｅｒとＭｏｓｔｏｖによる新生児ラットの腸に関する初期の記載（非特許文献６）以来、種々の研究により、各種起源の細胞内及び細胞間でのＩｇＧ輸送の調節においてＦｃＲｎが中心的役割を果たしていることが示された（非特許文献７～１３）。ＦｃＲｎはまた、血清中最も量の多い２種の可溶性タンパク質であるＩｇＧとアルブ

5

ミンが分解されないようにし、これらの半減期を延ばす役割もする（非特許文献１４～１６）。このメカニズムは、血管の内側を覆う内皮細胞により主に仲介されていると当初考えられていたが（非特許文献１７）、最近の知見から、このプロセスは他の細胞においても進行することが示唆されている（非特許文献１８及び１９）。これらの細胞内において、ＦｃＲｎは主に初期／リサイクルエンドソーム中に存在し、ここで、液相エンドサイトーシスにより取込まれたＩｇＧとアルブミンに遭遇する。エンドソームの酸性環境により相互作用が促進される。結合したＩｇＧとアルブミンは再度表面に戻され細胞から放出されるが、結合しなかったリガンドは下流に送られリソソームにより分解される（非特許文献２０及び２１）。より最近のデータは、ＩｇＧにより仲介されるファゴサイトーシスにおいてＦｃＲｎが主要な役割を果たすという新たな概念を支持するものである（非特許文献２２）。

【０００４】

この機能性ＦｃＲｎ分子は、ＭＨＣクラスＩ様のα鎖（又は重鎖）とベータ２－ミクログロブリン（β２ｍ；別名：軽鎖）から構成されるヘテロダイマーであり（非特許文献６）結合部位は異なるものの（非特許文献２３及び６）ｐＨ依存的に（非特許文献２０及び２４）ＩｇＧとアルブミンに結合する。

【０００５】

ＦｃＲｎは各種哺乳動物種からクローン化されており、例えばラット（非特許文献６）、マウス（非特許文献２５）、ヒト（非特許文献２６）、ウシ（非特許文献２７）、フクロネズミ（非特許文献２８）、ヒツジ（非特許文献２９）、ブタ（非特許文献３０及び３１）、ラクダとイヌ（非特許文献３２）からクローン化されている。より最近になって、本発明者らはウサギのＦｃＲｎα鎖をクローン化し特性評価した。ＦｃＲｎによって実現される機能の殆どはマウスの場合において記述されてきたが、他の哺乳動物を用いた研究から、ＩｇＧの異化におけるＦｃＲｎの役割は研究対象としたいずれの哺乳動物においても極めて重要であることが示唆されている（例えば、げっ歯類、ヒト、霊長類（非特許文献３３）、ブタ（非特許文献３４）、ウシ（非特許文献３５））。

【０００６】

最近、２種の異なるモデルマウスにおいて、ウシＦｃＲｎα鎖（ｂＦｃＲｎ）を過剰発現させることにより、これら動物のマウスＩｇＧの半減期が顕著に延びたことが示され（非特許文献３６及び１９）、これは、ｂＦｃＲｎがマウスβ２ｍ（ｍβ２ｍ）と機能的複合体を形成すること、そしてこの機能的複合体がマウス及びヒトＩｇＧに結合することを示している。本発明者らはまた、ｂＦｃＲｎをトランスジェニック（Ｔｇ）マウスに過剰発現させることにより（非特許文献３６）、免疫感作時にこれら動物が抗原特異的ＩｇＧ、ＩｇＭ産生レベルを顕

6

著に向上させることができることを見出した。

【０００７】

本願の優先日より先の出願ではあるが本願優先日後に公開された特許文献１はモノクローナル抗体の調製について開示しており、これはＦｃＲｎの遺伝子をコードする核酸を抗体産生細胞にトランスフェクトするものである。この遺伝子改変細胞はＦｃＲｎを発現し抗体産生が向上する。この著者らは、トランスジェニック動物の作製とその動物そのものの提供のいずれにおいてもそれを可能とする開示はしていないが、血中抗体レベルをアップレギュレートするために、ＦｃＲｎをコードする核酸の少なくとも一の（追加の）コピーを有する非ヒト動物の各種利点について言及している。しかしながら、この教示は明らかに理論上のものでしかなく、またインビボ（例えば、マウスの腹水）でのモノクローナル抗体産生に着目した記述に基づいている。従って、免疫応答の向上という点でのＦｃＲｎ過剰発現の利点については示されてはいなかった。

【０００８】

依然として本技術分野においては、診断用、研究用及び治療用免疫グロブリンを大量且つ高品質で提供するための改良が必要であることは明らかである。この必要性を満たすために、本発明は、抗原接種に対し応答した結果、大幅に向上した特異的体液性免疫反応レベルを示すトランスジェニック動物を提供する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】国際公開第２００７／０６１２９２号

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献1】Brambell F. W. R.（1958）The passiveimmunity of the young mammal. BiologicalReviews 33, 488－531.

【非特許文献2】Brambell F. W. R., Hemmings W. A. andMorris I. G.（1964） A theoretical model of gammaglobulin catabolism. Nature 203, 1352－1355.

【非特許文献3】Junghans R. P.（1997）Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. Immunol Res 16, 29－57.

【非特許文献4】Rodewald R.（1976） pH－dependent binding of

7
immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. J Cell Biol 71, 666−9.
【非特許文献5】Simister N. E. and Rees A. R. (1985) Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. Eur J Immunol 15, 733−8.
【非特許文献6】Simister N. E. and Mostov K. E. (1989) An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. Nature 337, 184−7.
【非特許文献7】Antohe F., Radulescu L., GafencuA., Ghetie V. and Simionescu M. (2001) Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. Hum Immunol 62, 93−105.
【非特許文献8】Claypool S. M., Dickinson B. L., Wagner J. S., Johansen F. E., Venu N., Borawski J. A., Lencer W. I. and Blumberg R. S. (2004) Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fc gamma−receptor. Mol Biol Cell 15, 1746−59.
【非特許文献9】Dickinson B. L., Badizadegan K., Wu Z., Ahouse J. C., Zhu X., Simister N. E., Blumberg R. S. and Lencer W. I. (1999) Bidirectional FcRn−dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. J Clin Invest 104, 903−11.
【非特許文献10】Kobayashi N., Suzuki Y., Tsuge T., Okumura K., Ra C. and Tomino Y. (2002) FcRn−mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 282, F358−65.
【非特許文献11】McCarthy K. M., Yoong Y. and Simister N. E. (2000) Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study protein transport across epithelia. J Cell Sci 113, 1277−85.
【非特許文献12】Ober R. J., Martinez C., Lai X., Zhou J. and Ward E. S. (2004) Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single−molecule level. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11076−81.
【非特許文献13】Spiekermann G. M., Finn P. W., Ward E. S., Dumont J., Dickinson B. L., Blumberg R. S. and Lencer W. I. (2002) Receptor−mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. J Exp Med 196, 303−10.
【非特許文献14】Ghetie V., Hubbard J. G., Kim J. K., Tsen M. F., Lee Y. and Ward E. S. (1996) Abnormally short serum half−livesof IgG in beta 2−microglobulin−deficient mice. Eur J Immunol 26, 690−6.
【非特許文献15】Israel E. J., Wilsker D. F., Hayes K. C., Schoenfeld D. and Simister N. E. (1996) Increased

9
clearance of IgG inmice that lack beta 2−microglobulin: possible protective role of FcRn. Immunology 89, 573−8.
【非特許文献16】Junghans R. P. and Anderson C. L. (1996) The protection receptor for IgG catabolism is the beta2−microglobulin−containing neonatal intestinal transportreceptor. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5512−6.
【非特許文献17】Borvak J., Richardson J., Medesan C., Antohe F., Radu C., Simionescu M., Ghetie V. and Ward E. S. (1998) Functional expression of the MHC class I−related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. Int Immunol 10, 1289−98.
【非特許文献18】Akilesh S., Christianson G. J., Roopenian D. C. and Shaw A. S. (2007) Neonatal FcR Expression in Bone Marrow−Derived Cells Functions to Protect Serum IgG from Catabolism. J Immunol 179, 4580−8.
【非特許文献19】Lu W., Zhao Z., Zhao Y., Yu S., Zhao Y., Fan B., Kacskovics I., Hammarstrom L. and Li N. (2007) Over−expressionof the bovine FcRn in the mammary glandresults in increased IgG levels in bothmilk and serum of transgenic mice. Immunology 122, 401−8.
【非特許文献20】Anderson C. L., Chaudhury C., Kim J., Bronson C. L., Wani M. A. and Mohanty S. (2006) Perspective − FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. Trends Immunol 27, 343−8.
【非特許文献21】Roopenian D. C. and Akilesh S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol 7, 715−25.
【非特許文献22】Vidarsson G., Stemerding A. M., Stapleton N. M., Spliethoff S. E., Janssen H., Rebers F. E., de Haas M. and vande Winkel J. G. (2006) FcRn: an IgG receptor on phagocytes with a novel role inphagocytosis. Blood 108, 3573−9.
【非特許文献23】Chaudhury C., Mehnaz S., Robinson J. M., Hayton W. L., Pearl D. K., Roopenian D. C. and Anderson C. L. (2003) The Major Histocompatibility Complex−related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin and Prolongs Its Lifespan. The Journal of Experimental Medicine 197, 315−322.
【非特許文献24】Chaudhury C., Brooks C. L., Carter D. C., Robinson J. M. and Anderson C. L. (2006) Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn−IgG interaction. Biochemistry 45, 4983−90.
【非特許文献25】Ahouse J. J., Hagerman C. L., Mittal P., Gilbert D. J., Copeland N. G., Jenkins N. A. and Simister N. E. (1993) Mouse MHC class I−like Fc receptor encoded outside the MHC. J Immunol 151, 6076−88.
【非特許文献26】Story C. M., Mikulska J. E. andSimister N. E. (1994) A major histocompatibility complex cla

11
ss I-like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. J Exp Med 180, 2377-81.
【非特許文献27】Kacskovics I., Wu Z., Simister N. E., Frenyo L. V. and Hammarstrom L. (2000) Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor. JImmunol 164, 1889-97.
【非特許文献28】Adamski F. M., King A. T. and Demmer J. (2000) Expression of the Fc receptor in the mammary gland during lactation in the marsupial Trichosurus vulpecula (brushtail possum). Mol Immunol 37, 435-44.
【非特許文献29】Mayer B., Zolnai A., Frenyo L. V., Jancsik V., Szentirmay Z., Hammarstrom L. and Kacskovics I. (2002) Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localizationin the small intestine of neonatal lambs. Immunology 107, 288-96.
【非特許文献30】Schnulle P. M. and Hurley W. L. (2003) Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. Vet Immunol Immunopathol 91, 227-31.
【非特許文献31】Zhao Y., Kacskovics I., Zhao Z. and Hammarstrom L. (2003) Presence of the di-leucine motif in the cytoplasmic tail of the pig FcRn alpha chain. Vet Immunol Immunopathol 96, 229-33.

12
【非特許文献32】Kacskovics I., Mayer B., Kis Z., Frenyo L. V., Zhao Y., Muyldermans S. and Hammarstrom L. (2006b) Cloning and characterization of the dromedary (Camelus dromedarius) neonatal Fc receptor (drFcRn). Dev Comp Immunol 30, 1203-15.
【非特許文献33】Ghetie V. and Ward E. S. (2002) Transcytosis and catabolism of antibody. Immunol Res 25, 97-113.
【非特許文献34】Harmsen M. M., Van Solt C. B., Fijten H. P. and Van Setten M. C. (2005) Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. Vaccine 23, 4926-34.
【非特許文献35】Kacskovics I., Kis Z., Mayer B., West A. P., Jr., Tiangco N. E., Tilahun M., Cervenak L., Bjorkman P. J., Goldsby R. A., Szenci O. and Hammarstrom L. (2006a) FcRn mediates elongated serum half-life of human IgG in cattle. Int Immunol 18, 525-36.
【非特許文献36】Bender B., Bodrogi L., Mayer B., Schneider Z., Zhao Y., Hammarstrom L., Eggen A., Kacskovics I. and Bosze Z. (2007) Position independent and copy-number-related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha-chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. Transgenic Res 16, 613-27.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

13

【００１１】
驚くべきことに、（ウシＦＣＧＲＴ遺伝子にコードされている）ウシＦｃＲｎα鎖をコピー数依存的に過剰発現させたＢＡＣＴｇマウスにおいて、ウシＦｃＲｎα鎖がマウスβ２ｍと機能的複合体を形成して体外から投与されたマウス及びヒトのＩｇＧの半減期を顕著に向上させただけではなく、免疫感作時にこれらトランスジェニック動物がその野生型コントロールに比べて大幅に向上した体液性免疫応答を示したことが見出された。抗原特異的抗体の大部分はＩｇＧであったが、ＩｇＭ価もまた二次免疫応答時に上昇した。考えうる理由について分析したところ、本発明者らは、ｂＦｃＲｎトランスジェニックマウスがその野生型コントロールに比べて、免疫感作時に抗原特異的Ｂ細胞と樹状細胞の数が大幅に増加していること、二次リンパ器官に好中球が大量に流入していることを見出した。
また、野生型コントロールにおいても顕著なものではないにせよ同様の変化が見られたことは注目に値する。以上より、ｂＦｃＲｎＴｇ動物における抗原特異的ＩｇＧとＩｇＭレベルの上昇は、ＩｇＧの保護が改善されたということのみによるのではなく、抗原特異的なＢ細胞のクローンの増殖が盛んになり、その野生型コントロールに比べて免疫グロブリンの合成がより安定的に行われたことの結果でもあることが示された。これらの結果は免疫応答におけるＦｃＲｎの新たな役割を指摘している。本発明は、通常の動物には見られない、ＦｃＲｎを顕著に過剰発現させた状態が、免疫感作時の免疫応答に対して大きな効果を有し、これにより各種抗原に対する種々の抗体を産生するのに特に有用である系が形成されることを初めて開示するものである。
【課題を解決するための手段】
【００１２】
従って本発明は、同一種の非トランスジェニック対照動物に比べて、抗原に対して向上した体液性免疫応答を発現することができるトランスジェニック（Ｔｇ）非ヒト動物の作製方法であって、向上したＭＨＣクラスＩ関連新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）活性を提供する遺伝子構築物を前記非ヒト動物に導入することを含む方法を提供する。
【００１３】
本発明は他のアスペクトにおいて、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ非ヒト動物であって、
前記動物がＦＶＢ／Ｎマウスである場合には、前記遺伝子構築物はバクテリア人工染色体（ＢＡＣ）クローン＃１２８Ｅ０４のウシのインサートの全部は含まず、
前記ＦｃＲｎがヒトＦｃＲｎ（ｈＦｃＲｎ）である場合には、前記遺伝子構築物は１０ｋｂの５’フランキング配列と１０ｋｂの３’フランキング配列とを有する完全ｈＦｃＲｎ遺伝子を含む３３ｋｂのヒトコスミドクローンと；サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）エンハンサーとトリβ－アクチンプロモーターとを有し、且つクローン化されたｈＦｃＲｎα鎖を有するベクターＥと；ヒト由来ＢＡＣライブラリーから取得した完全ｈＦｃＲｎ遺伝子を含む３４ｋｂＸｈｏＩ断片のいずれでもなく、
前記ＦｃＲｎがウシＦｃＲｎ（ｂＦｃＲｎ）である場合には、前記遺伝子構築物はｂＦｃＲｎのα鎖をコードする配列を含む、ｐＢＣ１－ｂＦｃＲｎのＮｏｔＩ－ＳａｌＩ断片と；ｂＦｃＲｎの軽鎖をコードする、ｐＢＣ１－ｂｂ２ｍのＮｏｔＩ－ＳａｌＩ断片のいずれでもなく、
前記ＦｃＲｎがネズミ科のＦｃＲｎ（ｍＦｃＲｎ）である場合には、前記遺伝子構築物はＩＦＡＢＰ－ｍＦｃＲｎとＩＦＡＢＰ－ｍｂ２ｍのいずれでもない、Ｔｇ非ヒト動物を提供する。
【００１４】
本発明はその更なるアスペクトにおいて、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ非ヒト動物の非治療的方法における使用であって、目的の抗原に対する向上した体液性免疫応答を前記動物に発現させるステップを含む使用を提供する。
【００１５】
本発明は更に他のアスペクトにおいて、免疫グロブリンの製造を可能とする確立された任意のプロトコールに従って、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用するステップを含む、免疫グロブリンを製造する方法を提供する。
【００１６】
好ましい実施形態においては、本発明は、体液性免疫応答の前記向上が、抗原による免疫感作時の免疫グロブリン産生レベルを向上させることを含み、前記免疫グロブリンに特異的な親和性を有するＦｃＲｎが前記免疫感作時に前記動物によって産生される、方法、使用又は動物を提供する。
【００１７】
好ましい実施形態においては、本発明は、体液性免疫応答の前記向上が抗原特異的なＢ細胞のクローンの増殖の向上を含む方法、使用又は動物を提供する。
【００１８】
好ましい実施形態においては、本発明は、体液性免疫応答の前記向上が好中球の二次リンパ器官への流入を刺激することを含む方法、使用又は動物を提供する。
【００１９】
好ましい実施形態においては、本発明は、体液性免疫応答の前記向上が樹状細胞及び／又はマクロファージの二次リンパ器官への流入を刺激することを含む方法、使用又は動物を提供する。
【００２０】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記二次リンパ器官が脾臓を含む方法、使用又は動物を提供する。

15

【００２１】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記抗原が弱免疫原である方法、使用又は動物を提供する。
【００２２】
本発明は他のアスペクトにおいて、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用することを含む免疫グロブリン製造方法であって、前記Ｔｇ動物が、同一種の非トランスジェニック対照動物に比べてより少ない抗原接種回数でこれと同一レベルの体液性免疫応答を発現するように、適用されるプロトコールを調整する少なくとも一のステップを含むことを特徴とする方法を提供する。
【００２３】
本発明は更に他のアスペクトにおいて、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用することを含む免疫グロブリン製造方法であって、前記Ｔｇ動物が、同一種の非トランスジェニック対照動物に比べてより早くこれと同一レベルの体液性免疫応答を発現するように、適用されるプロトコールを調整する少なくとも一のステップを含むことを特徴とする方法を提供する。
【００２４】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記動物が哺乳動物である方法、使用又は動物を提供する。
【００２５】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記動物がげっ歯類である方法、使用又は動物を提供する。
【００２６】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記げっ歯類がマウスである方法、使用又は動物を提供する。
【００２７】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記哺乳動物がウサギである方法、使用又は動物を提供する。
【００２８】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記哺乳動物がウシ、ブタ、ラクダ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ロバ及びウマから成る群から選択される方法、使用又は動物を提供する。
【００２９】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記トランスジェニック哺乳動物が、モノクローナル抗体産生に有用な系統又はモノクローナル抗体産生により適するように遺伝子的に改変された系統から得られる方法、使用又は動物を提供する。
【００３０】
本発明は他のアスペクトにおいて、本発明に係る動物から得られる細胞から作製されるか、又は本発明に係る方法若しくは使用に従って作製される若しくは使用される動物から得られる細胞から作製されることを特徴とするハイブリドーマ細胞株を提供する。

16

【００３１】
本発明は他のアスペクトにおいて、本発明に係る方法、使用又は動物により産生されることを特徴とするモノクローナル抗体を提供する。
【００３２】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記トランスジェニック動物が、ポリクローナル抗体産生に有用な系統又はポリクローナル抗体産生により適するように遺伝子的に改変された系統から得られる方法、使用又は動物を提供する。
【００３３】
本発明は他のアスペクトにおいて、本発明に係る方法、使用又は動物により産生されることを特徴とするポリクローナル抗体を提供する。
【００３４】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記免疫グロブリンがＩｇGである方法、使用又は動物を提供する。
【００３５】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記免疫グロブリンがＩｇMである方法、使用又は動物を提供する。
【００３６】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記動物がヒト又はヒト化免疫グロブリンの産生のために形質転換されている方法、使用又は動物を提供する。
【００３７】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記遺伝子構築物がＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする核酸配列の発現を提供する方法、使用又は動物を提供する。
【００３８】
好ましい実施形態においては、本発明は、ＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする前記核酸配列が突然変異している方法、使用又は動物を提供する。
【００３９】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記突然変異により前記ＦｃＲｎタンパク質のアルブミン結合部位の機能が失われる方法、使用又は動物を提供する。
【００４０】
好ましい実施形態においては、本発明は、前記核酸配列がキメラＦｃＲｎタンパク質をコードする方法、使用又は動物を提供する。
【００４１】
本発明は他のアスペクトにおいて、本発明に係るＴｇ動物又は本発明に係る方法によって得られるＴｇ動物から得られる動物繁殖材料であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むことを特徴とする動物繁殖材料を提供する。
【００４２】
好ましい実施形態においては、本発明は、精子、精原細胞、卵子、卵巣組織、胚及び体細胞クローニング用組織サンプルから成る群から選択される動物繁殖材料を提供

17

する。

【００４３】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記向上したＦｃＲｎ活性が、前記ＦｃＲｎをコードする核酸配列の一個より大の機能的コピーを前記動物のゲノムに組み込むことにより提供される方法、使用又は動物を提供する。

【００４４】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記遺伝子構築物がＢＡＣクローン＃１２８Ｅ０４のウシのインサート又はＢＡＣクローン＃２６２Ｅ０２のウサギのインサートを含む方法、使用又は動物を提供する。

【００４５】

本発明は他のアスペクトにおいて、アルブミンの製造を可能とする確立された任意のプロトコールに従って、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用するステップを含む、アルブミンの製造方法を提供する。

【００４６】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記遺伝子構築物がＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする核酸配列の発現を提供し、前記ＦｃＲｎタンパク質の免疫グロブリン結合活性が除かれている方法を提供する。

【００４７】

本発明は他のアスペクトにおいて、体液性免疫応答を向上させる必要のある患者の遺伝子治療に使用する遺伝子構築物であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を提供する。

【００４８】

本発明は他のアスペクトにおいて、体液性免疫応答を向上させる必要のある患者を治療する方法であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記患者に導入することを含む方法を提供する。

【００４９】

本発明は他のアスペクトにおいて、天然の免疫グロブリン産生により内因的にもたらされるか又は治療手段により外因的にもたらされる血清免疫グロブリンレベルを上昇させる必要のある患者の遺伝子治療に使用する遺伝子構築物であって、前記遺伝子構築物は向上したＦｃＲｎ活性を提供し、前記ＦｃＲｎは、前記患者によって産生されるか又は前記患者に投与される免疫グロブリンに特異的な親和性を有することを特徴とする遺伝子構築物を提供する。

【００５０】

本発明は他のアスペクトにおいて、血清免疫グロブリンレベルを上昇させる必要のある患者を治療する方法であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記患者に導入することを含み、前記ＦｃＲｎは、前記患者により産生されるか又は前記患者に投与される免疫グロブリンに特異的な親和性を有することを特徴とする

18

方法を提供する。

【００５１】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記患者がヒトである遺伝子治療のための遺伝子構築物又は方法を提供する。

【００５２】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記遺伝子構築物が前記ＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする核酸配列の発現を提供する、遺伝子治療のための遺伝子構築物又は方法を提供する。

【００５３】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記向上したＦｃＲｎ活性が、前記ＦｃＲｎをコードする核酸配列の一個より大の機能的コピーを前記患者のゲノムに組み込むことにより提供される、遺伝子治療のための遺伝子構築物又は方法を提供する。

【００５４】

好ましい実施形態においては、本発明は、ＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする前記核酸配列が突然変異している、遺伝子治療のための遺伝子構築物又は方法を提供する。

【００５５】

好ましい実施形態においては、本発明は、前記突然変異により前記ＦｃＲｎタンパク質のアルブミン結合部位の機能が失われる、遺伝子治療のための遺伝子構築物又は方法を提供する。

【００５６】

本発明は他のアスペクトにおいて、免疫応答の変化に関する条件について試験するのに有用なモデル動物の体液性免疫応答を向上させる方法であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記動物に導入するステップを含む方法。

【図面の簡単な説明】

【００５７】

【図１】１２８Ｅ０４ウシＢＡＣトランスジーンの構造及び特徴。Ａ：ｂＦＣＧＲＴと５種の推定タンパク質コード遺伝子（ＦＬＴ３ＬＧ、ＬＯＣ５３９１９６、ＬＯＣ５２２０７３、ＬＯＣ５１１２３４及びＬＯＣ５１１２３５）の相対位置に関する１２８Ｅ０４ＢＡＣゲノム断片の模式図。Ｂ：ＰＣＲで検出した組み込みトランスジーンのインタクトネス。Ｉ：トランスジェニック系統＃９由来ゲノムＤＮＡテンプレート；ＩＩ：トランスジェニック系統＃１４由来ゲノムＤＮＡテンプレート；ＩＩＩ：トランスジェニック系統＃１９由来ゲノムＤＮＡテンプレート；ＩＶ：コントロールＢＡＣ１２８Ｅ０４ゲノムＤＮＡテンプレート。スロット：ＭＭ：１ｋｂラダー、１：ＢＡＣ１２８Ｅ０４　５’末端特異的ＰＣＲ（以下同様）、２：ＦＬＴ３ＬＧ、３：ＬＯＣ５３９１９６、４：ＦＣＧＲＴ、５：ＬＯＣ５２２０７３、６：ＬＯＣ５１１２３４、７：ＬＯＣ５１１２３５、８：Ｂ

19

ＡＣ１２８Ｅ０４　３’末端。尚、ＬＯＣ５１１２３４、ＬＯＣ５１１２３５及び３’末端特異的断片はトランスジェニック系統＃９のゲノムＤＮＡからは増幅されなかった。

【図２】トランスジェニック系統＃１４及び＃１９由来の線維芽細胞のメタフェーズスプレッド。ＦＩＳＨ解析により、ｂＦＣＧＲＴを有する蛍光ラベルＢＡＣ１２８Ｅ０４クローンが、＃１４と＃１９マウスそれぞれの線維芽細胞の全く異なる染色体セグメントにハイブリダイズしていることが示され、このことはトランスジェニックマウス系統＃１４と＃１９の表現型が組み込み部位依存的であるという可能性を排除するものである。

【図３】定量的リアルタイムＰＣＲを用いてＴｇマウス（系統＃１４と＃１９）のｂＦｃＲｎコピー数の絶対数を決定するための、β－アクチンとｂＦｃＲｎα鎖（ｂＦＣＧＲＴ）それぞれの場合のＣｔ対ｌｏｇコピー数（Ｑ）の標準曲線。Ｃｔは、定量的リアルタイムＰＣＲにおいて蛍光強度が閾値を超えるときのサイクルである。蛍光性５ｋヌクレアーゼ技術（ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ　５ｋ　ｎｕｃｌｅａｓｅ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）（ＴａｑＭａｎ（Ｌｅｅら、１９９３））とＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ７０００　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ　Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ　ＣＡ、ＵＳＡ）を用いて検出を行った。

【図４】トランスジーンのコピー数に依存的なｂＦｃＲｎ特異的ｍＲＮＡ発現。Ａ：トランスジェニック系統＃９（１、４、７、１０）、＃１４（２、５、８、１１）、＃１９（３、６、９、１２）それぞれのヘミ接合体組織サンプルを用いたＲＴ－ＰＣＲ。スロット：ＭＷ：１ｋｂラダー；１～３：肺；４～６：肝臓；７～９：新生児の腸；１０～１２：乳腺。Ｂ：肝臓トータルＲＮＡサンプルにおけるｂＦｃＲｎα鎖ｍＲＮＡの発現を検出するノザン分析。スロット：１：野生型マウス；２：ウシ；３及び４：系統＃１４のヘミ接合体及びホモ接合体マウス（それぞれｂＦｃＲｎトランスジーンのコピーが２個の場合と４個の場合に対応する）；５及び６：系統＃１９のヘミ接合体及びホモ接合体マウス（それぞれｂＦｃＲｎトランスジーンのコピーが５個の場合と１０個の場合に対応する）。Ｃ：ノザン分析により検出した、トランスジーンのコピー数に依存的なｂＦｃＲｎ発現の定量的評価。カラムは光学密度（平均）を表し、エラーバーは平均の標準誤差を表す。統計的有意性は次のように示す：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１。

【図５】野生型マウスとＴｇマウスの肺における、ｂＦｃＲｎのコピー数に依存的なタンパク質レベル。アフィニティー精製済みウサギ抗血清を用いた、全細胞タンパク質（３０μｇ／レーン）のウェスタンブロット（Ｂ４：ｂＦｃＲｎα鎖が安定的にトランスフェクトされたＭＡＣ－Ｔ細胞株抽出物（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ａ）；ＷＴ：野生型マウス；ＴＧ２：ヘミ接合体マウス、系統＃１４；ＴＧ５：ヘミ接合体マウス、系統＃１９）。キロダルトン単位の分子量マーカーを左に示す。ｂＦｃＲｎがトランスフェクトされたポジティブコントロール細胞抽出物の場合（Ｂ４）と同様に、ｂＦｃＲｎα鎖特異的アフィニティー精製済み血清（Ｍａｙｅｒら、２００２）が、約４０ｋＤａのバンドとしてトランスジェニック肺組織サンプルに検出された。第２のバンド（破線矢印で示される）は受容体の非グリコシル化体の量があまり多くないことを示すと考えられる。ＴＧ２（トランスジーンのコピー数：２）とＴＧ５（トランスジーンのコピー数：５）におけるリコンビナントＦｃＲｎα鎖の量の比較から、コピー数依存的発現はｍＲＮＡレベルのみならずタンパク質レベルにおいても明らかに見られることが分かる。

【図６】ｂＦｃＲｎＴｇ（ｂＦｃＲｎを４コピー有する系統＃１４（ホモ接合体））とｗｔマウスにおける、マウスＩｇＧ（Ａ）及びヒトＩｇＧ（Ｂ）の薬物動態。（一次薬物動態パラメーターの幾何平均に基づいてシミュレートされた）モデル化データと、３～５匹の動物（若年同腹子）において観察された平均血清抗体濃度（μｇ／ｍＬ）とを、マウスＩｇＧ（１０ｍｇ／$BW_{kg}$）とヒトＩｇＧ（１０及び２０ｍｇ／$BW_{kg}$）注射後の時間の関数としてプロットした。挿入図は注射されたＩｇＧの半減期を示し、この半減期は、ツーコンパートメントモデルを採用したＷｉｎＮｏｎＬｉｎプロフェッショナルソフトウェアを用いて算出した。Ｔｇ動物におけるＩｇＧの半減期は野生型マウスに比べて有意に長かった。サンプルは２連でアッセイした。エラーバーは平均の標準誤差（ＳＥＭ）を表す。統計的有意性は次のように示す：＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１。

【図７】ｂＦｃＲｎの過剰発現の結果、その性質を損なわせることなしに、Ｔｇマウスにおける免疫応答が安定的に増強される。Ｔｇ、ｗｔマウスの腹腔内に先ずＯＶＡ＋ＣＦＡで免疫感作し、次いで１４日後にＯＶＡ＋ＩＦＡを接種した。連続的にサンプリングした血清について、ＯＶＡ特異的ＩｇＭとＩｇＧを分析した。Ｔｇマウスの場合、ＩｇＭ価は一次免疫応答時のＩｇＭレベルよりも二次免疫応答時に高く、また、ｗｔマウスに比べ有意に高かった。有意なレベルの差がＴｇとｗｔマウス間に見られた（Ａ）。二次免疫応答時にＴｇマウスでは、ＯＶＡ特異的ＩｇＧ価はｗｔ動物のそれの約３倍になった。有意なレベルの差がＴｇ、ｗｔマウス間に見られた（Ｂ）。免疫感作後３２日で、ＯＶＡ特異的ＩｇＧアイソタイプの力価を分析した。Ｔｇマウスは、有意に高い力価のＩｇＧアイソタイプ（ＩｇＧ３を除く）を産生したが、それらの間の比はｗｔマウスの場合に比べて相違がなかったことから、ｂＦｃＲｎの過剰発現により、Ｔｇマウスの体内環境を攪乱することなくＯＶＡ特異的ＩｇＧの産生量が向上したことが示される（Ｃ）。トータ

20

ルＩｇＧ産生量はＯＶＡ特異的ＩｇＧ価を反映するものであり、Ｔｇマウスはそのｗｔ兄弟に比べて有意に多い量のＩｇＧを産生した。特筆すべきは、Ｔｇマウスが免疫感作前でもより高いＩｇＧレベルを示したことである（Ｄ）。各値は平均±ＳＥＭで表される。尚、＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１；＊＊＊：ｐ＜０．００１；ｎｓ：ｐ＞０．０５である。

ＦＩＴＣ－ＯＶＡ免疫複合体の取込み効率をＦＡＣＳにより分析した（Ｅ）。黒色破線はＰ３８８細胞の自己蛍光を示し、灰色線は非免疫複合体化ＯＶＡ－ＦＩＴＣの取込みを示し、黒色線はｗｔ血清から調製したＯＶＡ－ＦＩＴＣ免疫複合体の取込みを示し、灰色に塗られた領域はＴｇ血清から調製されたＯＶＡ－ＦＩＴＣ免疫複合体の取込みを示す。

本発明者らは、血清を２．５μＬ用いた場合には、ＯＶＡ－ＦＩＴＣの取込みに比べて食作用は向上しないことを見出した（２．５μＬ）。しかしながら、Ｔｇマウス由来の血清を１０μＬ用いた場合には著しい向上が見られた。一方、ｗｔマウス由来の血清の場合、同量では食作用の向上はなかった（１０μＬ）。最後に、Ｔｇ、ｗｔマウスそれぞれの血清を４０μＬ用いた場合にはいずれの場合も、非免疫複合体化ＯＶＡ－ＦＩＴＣに比べて食作用の向上がみられた（４０μＬ）。

【図８】Ｔｇ及びｗｔマウスは、ＦＩＴＣ－デキストランを用いた免疫感作に対して同様な応答を示す。Ｔｇ（系統＃１４）とｗｔマウスに対してＦＩＴＣ－デキストランを腹腔内に免疫感作し、続いて２週間後にこれと同様にして接種した。本発明者らは、一次感作時のＦＩＴＣ特異的ＩｇＭについてはＴｇ、ｗｔ動物間で差がないことを観察した。免疫感作の経過中、免疫応答について分析したところ、本発明者らは、二次免疫感作後にはＴｇ及びｗｔマウスの双方においてＩｇＭ産生が向上されたことを見出した。

【図９】ＯＶＡ＋ＣＦＡで免疫感作し、その１４日後にＯＶＡ＋ＩＦＡを接種したマウス（各群３匹の雄性マウス）に由来する、２５日目に回収された脾臓細胞。Ｔｇマウスの脾臓においては、ｗｔマウスと比較しＯＶＡ特異的ＩｇＭ産生細胞数が２倍になり、またＯＶＡ特異的ＩｇＧ細胞数が３倍超となった（Ａ）。ＯＶＡによる免疫感作後２５日で、ｗｔとＴｇマウスの双方で脾臓重量（Ｂ）と細胞数（Ｃ）が増加したが、脾臓サイズと細胞数はｗｔマウスに比べＴｇマウスにおいて顕著な増加が見られた。各値は平均±ＳＤで表される（＊：ｐ＜０．０５；＊＊＊：ｐ＜０．０１；ｐ＞０．００１）。

【図１０】正常又はＯＶＡ免疫感作済み（免疫感作後２５日）ｗｔ、Ｔｇマウスの脾臓の細胞内分布解析。本発明者らは、免疫感作後における、ＣＤ４５Ｒ／Ｂ２２０を有する細胞（Ｂリンパ球）とＩ－Ａ／Ｉ－Ｅ（ＭＨＣクラスＩＩ）抗原の割合が有意に減少したことを見出した（ｐ＜０．０５）。ＣＤ３マーカーを有する細胞（Ｔ



リンパ球）に関しては、ｗｔとＴｇマウスのいずれの場合も差がないか或いはそれ程急激ではない減少が見られた。このヒストグラムは、ＣＤ４５Ｒ／Ｂ２２０を有する細胞（Ｂリンパ球）、ＣＤ３を有する細胞（Ｔリンパ球）及びＩ－Ａ／Ｉ－Ｅ（ＭＨＣクラスＩＩ）抗原のパーセンテージ（平均±ＳＤ）（破線の領域）とアイソタイプ特異的コントロール（黒色線）を示す。

実施した２回の実験のうち典型的な１回の実験について示す（各群ｎ＝３マウス）。

【図１１】免疫感作によりもたらされた好中球の脾臓への著しい流入。免疫感作後２５日で脾臓に遊走する細胞を更に特性評価するために、本発明者らは、二重標識技法を用いてフローサイトメトリーによりこれら細胞を分析した。本発明者らは、免疫感作後、ＣＤ１１ｂ$^{hi\,gh}$とＧｒ－１$^{hi\,gh}$抗原を有する細胞がｗｔマウスにおいて約５倍に、Ｔｇマウスにおいては９倍に増加したことを見出した（Ａ）。本発明者らはまた、ＣＤ１１ｂとＭＨＣクラスＩＩ抗原を有する細胞（マクロファージ、樹状細胞）の割合、（Ｂ）ＣＤ１１ｂ抗原とＣＤ１１ｃ抗原を有する細胞（樹状細胞）の割合（Ｃ－ゲートセル（ｇａｔｅｄ　ｃｅｌｌｓ））は、Ｔｇマウスにおいてそのｗｔコントロールよりも有意に上昇していることを見出した。密度をプロットしたグラフは、実施した２回の実験のうち典型的な１回の実験のものを示す（各群ｎ＝３マウス）。棒グラフの値は平均±ＳＤで表される（＊：ｐ＜０．０５；＊＊：ｐ＜０．０１）。

【図１２】ｂＦｃＲｎ特異的ＲＴ－ＰＣＲを用いた、腹膜細胞由来の好中球とマクロファージにおけるｂＦｃＲｎの発現分析。Ｔｇマウスのサンプルを用いたｂＦｃＲｎ特異的アンプリコンの増幅に成功した。ラベル：Ｍ１：ＢｅｎｃｈＴｏｐ１００ｂｐＤＮＡラダー（Ｐｒｏｍｅｇａ）；１：ｗｔマウス由来未精製腹膜細胞；２：Ｔｇマウス由来未精製腹膜細胞；３：フローサイトメトリーにより分析されたＴｇマウス由来の精製好中球（ＣＤ１１ｂ$^{hi\,gh}$、Ｇｒ－１$^{hi\,gh}$）、マクロファージと樹状細胞（ＣＤ１１ｂ$^{hi\,gh}$、Ｇｒ－１$^{low}$）；４：ｂＦｃＲｎα鎖のｃＤＮＡを含むプラスミドを用いた増幅。矢印はｂＦｃＲｎに特異的な５４８ｂｐのＤＮＡバンドを示す。密度をプロットしたグラフは、実施した２回の実験のうち典型的な１回の実験について示す。

【図１３】脾臓におけるＯＶＡ－ＦＩＴＣ含有細胞の存在量。ＯＶＡ免疫感作（免疫感作後５６日の）トランスジェニックマウス（ホモ接合体＃１４）と未免疫感作トランスジェニックマウスとに対し、ＯＶＡ－ＦＩＴＣで腹腔内処理した。この処置から５時間後に脾臓細胞をフローサイトメトリーで分析したところ、本発明者らは、ＯＶＡ免疫感作マウスの脾臓中に１５．１±１．４％のＯＶＡ－ＦＩＴＣ陽性細胞が存在していることを見出したが、一方、未免疫感作マウスにおいてはＯＶＡ－ＦＩＴＣ陽性細胞数は多くは見られなかった（２．１±０．

３％）。共焦点像は、ＯＶＡ免疫感作マウスと未免疫感作マウスの脾臓に由来する細胞を示す。この細胞の核はＤＲＡＱ５赤色蛍光細胞透過性ＤＮＡプローブで染色されており、ＦＩＴＣ－ＯＶＡは明るいスポットとして見ることができる（Ａ）。ＦＩＴＣ陽性細胞のうち、ＯＶＡ免疫感作マウスでは６１．２±５．４％がＢ２２０陽性であり（Ｂリンパ球）、１８．５±０．６％がＣＤ１１ｂ$^{ｈｉｇｈ}$、Ｇｒ－１$^{ｈｉｇｈ}$（好中球）であり、１３．５±２．１％がＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ陽性（樹状）細胞であった（Ｂ）。ＯＶＡ－ＦＩＴＣは多葉の核を有する典型的な好中球に取込まれる一方で、大きな球形の核とその周縁に薄く細胞質を有する細胞、恐らくはＢリンパ球の表面にＯＶＡ－ＦＩＴＣは検出される（Ｃ）。密度をプロットしたグラフとヒストグラムは典型的な１回の実験について示し（各群ｎ＝３マウス）、データは細胞のパーセンテージで示す（平均±ＳＤ）。スケールバーは１０μｍである。

【図１４】ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎトランスジェニックファウンダーマウスのＲＴ－ＰＣＲ解析。Ａ：Ｐ２プロモーター用に設計されたプライマーを用いたＲＴ－ＰＣＲ、予想される断片サイズ：５７９ｂｐ、Ｂ：ウシＦｃＲｎエキソン４用に設計したプライマーを用いたＲＴ－ＰＣＲ、予想される断片サイズ：１６１ｂｐ。サンプル：１．ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎマウスの肺；２．ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎマウスの肝臓；３．ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎマウスの腸；４．ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎマウスの脾臓；５．ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎマウスのゲノムＤＮＡ；６．ウシゲノムＤＮＡ；７．対照マウスゲノムＤＮＡ；８．ウシ肝臓ｃＤＮＡ；９．対照マウスｃＤＮＡ；１０．ネガティブコントロール。

【図１５】ｂＦｃＲｎの過剰発現はアルブミン代謝に大きく影響する。ＦｃＲｎ欠損（ＦｃＲｎ　ＫＯ）のｗｔ、ホモ接合性＃１４及び＃１９（それぞれ４コピーと１０コピーのｂＦｃＲｎを発現）の血清アルブミンレベル。本発明者らがアルブミンレベルについて比較したところ、ＫＯとＷＴマウス間（ｐ＜０．０１）、ＷＴとＴＧ４又はＴＧ１０マウス間（ｐ＜０．００１）に有意差が見られた。

【図１６】ＦｃＲｎ$^{－／－}$（ＫＯ）マウスとＦｃＲｎ$^{－／－}$ウシＦｃＲｎトランスジェニック（ＫＯｂＦｃＲｎ）マウスにおけるウサギＩｇＧのクリアランス。Ａ．ｂＦｃＲｎ／ｍＦｃＲｎ$^{－／－}$の遺伝子型を有するＦ２マウス（長方形で示される）を同定するために行った多重ＰＣＲ。Ｆ２マウスは、ｂＦｃＲｎ／ｍＦｃＲｎＸｍＦｃＲｎ$^{－／－}$ｎｅｏ$^{＋}$の親系統を交配させて得られたＦ１マウスを交配させることにより作製した。プライマーについては実施例１２で述べる。予想される断片サイズはｂＦｃＲｎ：６１０ｂｐ；ｎｅｏ：３４５ｂｐ；ｍＦｃＲｎ：２７８ｂｐである。スロット：１．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；２．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{－}$；３．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；４．ｂＦｃＲｎ$^{－}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{－}$；５．ｂＦｃＲｎ$^{－}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{－}$；６．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；７．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{－}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；８．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；９．ｂＦｃＲｎ$^{－}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；１０．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；１１．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{＋}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；１２．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{－}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；１３．ウシゲノムＤＮＡ；１４．ｂＦｃＲｎ$^{＋}$、ｎｅｏ$^{－}$、ｍＦｃＲｎ$^{＋}$；１５．ネガティブコントロール。Ｂ．ＦｃＲｎ$^{－／－}$（ＫＯ）マウスとＦｃＲｎ$^{－／－}$ウシＦｃＲｎトランスジェニック（ＫＯｂＦｃＲｎ）マウスにおけるウサギＩｇＧの薬物動態。ウサギＩｇＧはＦｃＲｎ$^{－／－}$マウスでは素早く排出された（半減期：１５時間）が、ｂＦｃＲｎ／ＦｃＲｎ$^{－／－}$では保護されていた（半減期：６７時間）。これらのマウスにウサギＩｇＧを１５０μｇ静脈内注射した。３マウス／群を処理した。得られたデータは２種の別々の実験に相当する。データには、平均値と、平均の標準誤差（ＳＥＭ）を表すエラーバーとを示す。

【図１７】ｂＦｃＲｎトランスジェニックウサギのＰＣＲ解析。ウシＦＣＧＲＴ４番エキソン検出用に設計したプライマーを用いて行ったＰＣＲ。予想されるサイズは１６０ｂｐである。サンプル：１．３８／ＪＴウサギゲノムＤＮＡ；２．ウシゲノムＤＮＡ；３．ＦＶＢ／ｎマウスゲノムＤＮＡ；４．ブランクコントロール；ＭＭ：１ｋｂラダー。

【図１８】２６２Ｅ０２ウサギＢＡＣの特性評価。ウサギ遺伝子の存在の評価に用いたプライマーとＰＣＲ条件については実施例１５の表７に述べる。

【発明を実施するための形態】

【００５８】

本発明はその第１のアスペクトにおいて、同一種の非トランスジェニック対照動物に比べて、抗原に対して向上した体液性免疫応答を発現することができるＴｇ非ヒト動物の作製方法であって、向上したＭＨＣクラスＩ関連新生児型Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）活性を提供する遺伝子構築物を前記非ヒト動物に導入することを含む作製方法を提供する。

【００５９】

本発明はその第２のアスペクトにおいて、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ非ヒト動物を提供する。これに関し、ＦｃＲｎトランスジーンを有するＴｇ動物について論じている最先端の開示の幾つかに言及しておく必要がある。しかしながら、これらの開示内容はいずれもアクシデンタルアンティシペーション（ａｃｃｉｄｅｎｔａｌ　ａｎｔｉｃｉｐａｔｉｏｎ）とみなされるべきものである。以下、これらについて述べる。

25

【００６０】
Ｂｅｎｄｅｒらは（Ｂｅｎｄｅｒら、２００４）は、ウシＦｃＲｎのインビボでの機能と転写制御について研究するために、ウシＢＡＣクローン＃１２８Ｅ０４を用いてウシＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする遺伝子をＦＶＢ／Ｎマウスに導入することにより作製したＴｇ動物を開示した。この刊行物には、本明細書に開示されるトランスジェニック動物の具体的な特徴は開示されていない。しかしながら、検討されてはいないもののこれらの特徴は確かに存在していたであろうと考えられる。従って、この開示内容はアクシデンタルアンティシペーションとみなされるべきことは明らかである。

【００６１】
ＵＳ２００６／００３１９５４とＰｅｔｋｏｖａらは（Ｐｅｔｋｏｖａら、２００６）は、ＦｃＲｎがホモ接合破壊されており且つヒトＦｃＲｎ（ｈＦｃＲｎ）トランスジーンを含むＴｇノックアウトマウスを開示している。この付加により、外因的に投与されたヒトＩｇＧの半減期が有意に向上すると共に内因性発現レベルと同程度のｈＦｃＲｎ発現がもたらされる。彼らまた、何ら具体的な事項を付け加えることなく、内因性の場合よりも実質的に高いレベルでＦｃＲｎを発現することは有用となり得ると述べている。強力な発現ベクターを用いることによって、その発現レベルが内因性の発現レベルの１０～１００倍にまで上昇し得ることが推測される。これらの開示は、Ｔｇ動物を得るための数種の異なる構築物について教示している。第１の例は、１０ｋｂの５’フランキング配列と１０ｋｂの３’フランキング配列とを有する完全ｈＦｃＲｎ遺伝子を含む３３ｋｂヒトコスミドクローンを用いた例である。この著者らはこのＴｇ動物を「ゲノムｈＦｃＲｎトランスジェニック系統３２」と称した。第２の例は、「ｃＤＮＡトランスジェニック系統２７６」が有する遺伝子構築物であり、これはＣＭＶエンハンサーとトリβ－アクチンプロモーターとを有するベクターＥにクローン化されたｈＦｃＲｎα鎖を含む。第３の例は、彼らの作製したトランスジェニック動物が有する遺伝子構築物であり、これはＧｅｎｏｍｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｉｎｃ．から入手したヒト由来細菌人工染色体（ＢＡＣ）ライブラリーから得た完全ｈＦｃＲｎ遺伝子を含む３４ｋｂＸｈｏＩ断片を含む。著者らは、直接的な遺伝子操作（Ｃ５７ＢＬ／６ＪマウスやＢＸＳＢ／ＭｐＪマウス等を用いる）又は従来の交配（例えば、ＭＲＬ／ＭｐＪ系統とＮＺＭ２４１０系統を用いる）のいずれかにより数種のＴｇマウス系統を作製したと考えられ、従って、全ての動物を正確に列挙することは殆ど不可能である。従ってこれらのＴｇ動物については、それらが有する遺伝子構築物に基づきディスクレームする。

【００６２】
Ｌｕらは、乳腺特異的調節エレメントを有する構築物を用いることにより作製したｂＦｃＲｎをその乳腺に有するＴｇマウスを開示した（Ｌｕら、２００６）。ｂＦｃＲｎのコピー数が１～１５の範囲内でそれぞれ異なり且つウシβ２ｍのコピー数が１～１０の範囲である幾つかのマウス系統が確立された。発現について検討がなされ、血清ＩｇＧレベルのばらつきについて文献報告されている。しかしながらこの系は、腺房の乳腺上皮細胞において限定されたｂＦｃＲｎ発現を泌乳時に提供するだけであり、泌乳乳腺におけるＩｇＧ輸送の研究に用いられた。これらの動物は免疫応答の分析には用いられていない。これらのＴｇマウスを作製するために用いる構築物は、ヤギベーターカゼインプロモーターにより目的の挿入遺伝子の転写が調節される２種の発現ベクターであり、一方は重（α）鎖（ｐＢＣ１－ｂＦｃＲｎ）をコードする配列を含み、他方はウシＦｃＲｎの軽鎖（ｐＢＣ１－ｂβ２ｍ）をコードしている。Ｔｇ動物に挿入されている遺伝子構築物は、ＮｏｔＩとＳａｌＩの各酵素を用いて消化し得られる断片、即ち、１６．９キロベース（ｋｂ）重鎖と１６．１ｋｂ軽鎖であり、これらは互いに等濃度でＫｕｎｍｉｎｇ　Ｗｈｉｔｅマウスの受精卵にマイクロインジェクションされた。

【００６３】
Ｙｏｓｈｉｄａら（Ｙｏｓｈｉｄａら、２００６）は、腸上皮での抗菌免疫の仲介におけるマウスＦｃＲｎ（ｍＦｃＲｎ）の役割について研究を行った。彼らは、組織特異的腸脂肪酸結合タンパク質遺伝子プロモーター（ＩＦＡＢＰ）によりｍＦｃＲｎとｍβ２ｍが特異的に腸上皮細胞において発現させられるＦｃＲｎＴｇマウス系統を確立し、ＩＦＡＢＰ－ｍＦｃＲｎＴｇ／ｍβ２ｍＴｇマウスとした。これらのマウスにおいては、ＦｃＲｎトランスジーンの発現が基質によって制限されないようにβ２ｍも過剰発現するようにしている。ここで再度、このＴｇ動物をＦｃＲｎ－／－マウス、そしてＢＡＬＢ／ｃ又はＣ５７ＢＬ／６（ＣＤ４５．２＋）と更に戻し交配した。

【００６４】
上述の刊行物についてその研究上の性質のため、上述のものと同様又は異なる遺伝子構築物を用いて各著者らが他のトランスジェニック系統数種を作製していたという可能性もあるが、これらについては前記刊行物中に明確に開示されてはいない。これらの動物もまた、アクシデンタルアンティシペーションとみなされることは明らかであり、従って、既に述べたものと僅かに異なる遺伝子構築物を有する可能性のある、例えば「トランスジェニック系統Ｘ」についての言及はいずれも、この議論に含まれることを意図している。

【００６５】
従って、上述のアクシデンタルアンティシペーションを回避するために、本発明に係るＴｇ動物に関して次のディスクレームを行う。即ち、

27

前記動物がＦＶＢ／Ｎマウスである場合には、前記遺伝子構築物はバクテリア人工染色体（ＢＡＣ）クローン＃１２８Ｅ０４のウシのインサートの全部は含まず、
前記ＦｃＲｎがヒトＦｃＲｎ（ｈＦｃＲｎ）である場合には、前記遺伝子構築物は１０ｋｂの５’フランキング配列と１０ｋｂの３’フランキング配列とを有する完全ｈＦｃＲｎ遺伝子を含む３３ｋｂのヒトコスミドクローンと；サイトメガロウィルス（ＣＭＶ）エンハンサーとトリβ－アクチンプロモーターとを有し、且つクローン化されたｈＦｃＲｎα鎖を有するベクターＥと；ヒト由来ＢＡＣライブラリーから取得した完全ｈＦｃＲｎ遺伝子を含む３４ｋｂＸｈｏＩ断片のいずれでもなく、
前記ＦｃＲｎがウシＦｃＲｎ（ｂＦｃＲｎ）である場合には、前記遺伝子構築物はｂＦｃＲｎのα鎖をコードする配列を含む、ｐＢＣ１－ｂＦｃＲｎのＮｏｔＩ－ＳａｌＩ断片と；ｂＦｃＲｎの軽鎖をコードする、ｐＢＣ１－ｂｂ２ｍのＮｏｔＩ－ＳａｌＩ断片のいずれでもなく、
前記ＦｃＲｎがネズミ科のＦｃＲｎ（ｍＦｃＲｎ）である場合には、前記遺伝子構築物はＩＦＡＢＰ－ｍＦｃＲｎとＩＦＡＢＰ－ｍｂ２ｍのいずれでもない。

【００６６】

本明細書において「非ヒト動物」という用語は、脊椎動物に属する動物を包含し、好ましくは哺乳動物である。本発明を適用可能な動物は、免疫グロブリン又はその機能的等価物を産生できるかどうかという機能上の基準に基づいて選択することができる。好ましい実施形態においては、本発明の動物として、マウス、ラット、その他のげっ歯類、ウサギ、ブタ、ラクダ科動物、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ロバ及びウマ等を挙げることができるが、これらに限定されない。更により好ましい実施形態においては、動物はマウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ヤギ及びウシである。また、本技術分野において免疫グロブリン（モノクローナル抗体又はポリクローナル抗血清）を製造するために一般に使用される任意の動物を使用することは本発明の範囲内である。

【００６７】

本明細書において「同一種の対照動物」又は「同一種の非トランスジェニック対照動物」という表現は、本発明のＴｇ動物の作製に関わる手続に付されなかった動物を記述するために用いられる。しかしながら、この同一種の対照動物もまた、全抗体製造プロセス、及びポリクローナル又はモノクローナル抗体の製造に必要な手続（例えば、初回免疫や必要に応じて行われる一回又は複数回の追加免疫）において本発明のＴｇ動物と同様に処理される。

【００６８】

本明細書において「免疫グロブリン」という用語は、抗体として機能する免疫グロブリンスーパーファミリーにおける糖タンパク質を意味する。本明細書中、「抗体」

28

と「免疫グロブリン」という用語は相互交換可能に使用される。抗体とは、適応免疫系の主要なエフェクターの内の一種を構成するホストタンパク質である。その有用性は、診断用及び研究用試薬としてこれまで広く利用されてきたし、現在も利用され続けている。抗体はまた、疾病治療のための臨床医の医療設備の中でも重要な治療道具となってきている。抗体は分析、精製及び濃縮に用いられ、生理学的応答を仲介又は調節する。抗原に対する高親和性結合能と特異性とが、種々の科学及び医学専門領域において抗体が広く用いられている要因となっている。抗原－抗体相互作用は、抗体の本来的な生物学的機能と研究用及び治療用試薬としての使用において重要である。

【００６９】

構造的には、抗体は（タンパク質電気泳動のγ画分の）グロブリンである。哺乳動物では５種類の抗体が存在する（即ち、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ（ここでＩｇは免疫グロブリンの略であり、本明細書中では抗体を表すためにも用いられる））。これらは重鎖定常部における相違に基づいて分類される。各免疫グロブリンクラスは生物学的性質が異なり、種々の抗原に対処するように進化してきた。ＩｇＡは粘液を含む各種領域（例えば消化管、呼吸管又は尿生殖路）に存在することができ、粘膜領域における病原体のコロニー形成を防ぐ。ＩｇＤは主にＢ細胞上の抗原受容体として機能する。ＩｇＥはアレルゲンと結合し肥満細胞からのヒスタミン放出を引き起こし（アレルギーの根底にあるメカニズム）、またヘルミンス（ぜん虫）に対する防御を提供する。ＩｇＭはＢ細胞表面に発現すると共に、Ｂ細胞が仲介する免疫の初期段階において病原体を除去する分泌型としても発現する。ＩｇＧは進入病原体に対する抗体免疫の大部分を担う。

【００７０】

本発明の好ましい実施形態においては、産生される免疫グロブリンはＩｇＧであるが、次に述べるように、本発明の範囲はＩｇＧアイソタイプ（クラス）又は各種の修飾を施されることもあるＩｇＧに限定されるものではない。

【００７１】

ＩｇＧは、各種哺乳動物における遺伝子重複に基づいて種々の型、即ちサブクラスに分類することができる。げっ歯類、ヒト、家畜化された反芻動物、ウマ、ブタ、ラクダ科動物及びモルモットではＩｇＧのサブクラスが多数あり、各サブクラスが異なる生物学的特徴を有している。例えば、ヒトＩｇＧ１とＩｇＧ３はＦｃγＲ１に高い親和性を有するので食細胞に結合する。従って、ＩｇＧ１とＩｇＧ３は特に、（ａ）小さなＩｇＧ－Ａｇ複合体を除去すること、（ｂ）Ｂ細胞の成長と抗体産生を正方向又は負方向に刺激すること、において重要となる可能性がある。ＩｇＧ３は補体の強力なアクチベーターで

29

あり、ＩｇＧ１は優先的に胎盤を通過して輸送される主な血清ＩｇＧである（Ｊａｎｅｗａｙ Ｊｒ．ら、２００１）。サブクラスの多様性は哺乳動物において顕著であることは良く知られている。ウサギはＩｇＧの遺伝子を１種だけ有するのに対して、マウスとヒトは４種のＩｇＧを発現し、ウマでは７種である。ウシは３種のＩｇＧを有し、ブタには５種の推定ＩｇＧサブクラス遺伝子が存在する。あまり良く研究されていない哺乳動物の免疫グロブリンサブクラスにおいても同様に、生物学的機能や相対的発現量の相違が見られると考えられる（Ｂｕｔｌｅｒ、２００６）。

【００７２】

本発明は、ＩｇＧサブタイプのいずれか一種以上の産生を向上させるために用いることができ、このＩｇＧサブタイプは特に限定されない。しかしながら、レシピエント動物により産生されるある種のＩｇＧアイソタイプが、特定の外因性ＦｃＲｎα鎖を含むＦｃＲｎタンパク質に対して、これとは別の外因性ＦｃＲｎα鎖を含むＦｃＲｎタンパク質に対してよりも強く結合するようにさせることができる。特定のＩｇＧサブタイプに対して最適な結合能と活性を有する特定のＦｃＲｎα鎖トランスジーンを選択しこれを用いることにより、得られる抗血清中の該特定のＩｇＧサブタイプの量又は割合を増大させることは本発明の範囲内である。

【００７３】

本発明の他の好ましい実施形態においては、産生される免疫グロブリンはＩｇＭである。ＩｇＭは血漿中の免疫グロブリン全体の約１０％を占め、複雑な抗原性を有する細胞膜抗原、感染性微生物、可溶性抗原に対して産生される初期の抗体の主要成分を成す。構造に関しては、ＩｇＭはインビボにおいて五量体構造を有する。ＩｇＭの五量体構造を構成する５個のサブユニットはＩｇＧと同様に４本の鎖から成る構造である。ＩｇＧの構造との主な相違点の一つとして、ＩｇＭはμ重鎖を有することを特徴とする。更に、μ鎖の定常部にはγ鎖よりもドメインが１個多く、またＩｇＭはＪ鎖と呼ばれるポリペプチド鎖を有するという点においても異なる。Ｊ鎖はＩｇＧには存在せず、ＩｇＭが抗体産生細胞から分泌される前に行われるμ鎖の重合を促進させると考えられている。本技術分野においては、天然物と機能的に等価なＩｇＭを組み換え技術により製造するための様々な試みがなされている（例えば、ＵＳ２００７１５４４６９参照）。異種の又は改変した免疫グロブリン遺伝子を動物に導入することによってＩｇＭ産生量を高めようとするアプローチとは異なり、本発明は、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を提供し、該動物の抗原に対する応答時の内因性ＩｇＭ産生量を向上させるという別の解決策を提供する。

【００７４】

本明細書において「体液性免疫応答」という用語は、分

30

子及び生物に応答して抗体が産生されて、これら分子及び生物が最終的に中和及び／又は排除される生体内のプロセスを意味する。抗体応答の特異性は、単一の特異性を有する抗原に結合する膜結合性受容体を通してＴ及び／又はＢ細胞により仲介される。適切な抗原に結合し、他の各種活性化シグナルを受け取った後、Ｂリンパ球が分裂し記憶Ｂ細胞を生成すると共に最終的に抗体分泌型形質細胞クローンに分化する。各クローンは、抗原受容体により認識された抗原エピトープと同一の抗原エピトープを認識する抗体を産生する。その後、記憶Ｂリンパ球は、それらに特異的な抗原によって活性化されるまで休止状態になる。これらのリンパ球は細胞性記憶を有し、特異的抗原に再度曝露された際の抗体応答が増強される。

【００７５】

体液性免疫応答に関連して「向上した」という用語は、同一種の対照動物がある種の抗原に接触したときに該抗原に対する免疫応答により産生される抗体に比べて、ある種の抗原に対する免疫応答により産生される抗体の産生レベル及び多クローン性が顕著に高いこと、前記免疫応答の発現が顕著に早いこと、又はある種の抗原に応答した免疫応答がより安定的であることを意味する。

【００７６】

本明細書において「免疫感作」という用語は、自身に対する免疫系が強化されるように設計されている剤（多くの場合アジュバントと併用される）に個体を曝露するプロセスを意味する。この剤を「免疫原」又は「抗原」という。免疫感作は予防接種、ワクチン接種と同じであり、これらも免疫感作と同様に生の感染剤を使用している。初回免疫感作プロセスに加えて、この剤を周期的に繰り返し注射することにより免疫感作の効果が向上することが見出されており、これを「追加」免疫感作という。

【００７７】

免疫感作に関連して免疫グロブリンの「向上したレベル」という表現は、免疫応答の強度によって測定される（例えば、得られる最大抗体価に基づいて測定される）、同一種の対照動物における特定の免疫グロブリンの血清レベルよりも顕著に高い同一免疫グロブリンの血清濃度を意味する。通常、この向上したレベルとは、少なくとも５０％以上であり、好ましくは７５％以上、より好ましくは１００％以上、更により好ましくは１５０％以上である。

【００７８】

免疫感作の結果は抗原の性質に大きく依存する。免疫応答を誘導することができれば如何なる物質も免疫原性があるということができ、免疫原と称されることは広く受け入れられている。免疫原と抗原との間には運用上明らかな相違点がある。抗原は特異的な抗体と結合できる任意の物質と定義される。従って、抗原はいずれも特異的な抗体を誘導する能力を有してはいるが、抗原によって

は抗体誘導のために免疫原に結合していることを必要とするものもある。このことは、免疫原は全て抗原であるが、抗原は必ずしも免疫原性があるとはならないことを意味している。実験免疫学で最もよく用いられる抗原はタンパク質であり、タンパク質に対する抗体は実験生物学及び実験医学において極めて有用である。しかしながら、精製タンパク質は常に高い免疫原性を有しているとは限らず、免疫応答を惹起するためにはアジュバントと組み合わせて投与する必要がある。炭水化物、核酸その他の分子はいずれも潜在的な抗原ではあるが、タンパク質キャリアに結合させた場合にのみ免疫応答を誘導するということも多い。従って、タンパク質抗原の免疫原性がほぼ全ての免疫応答の結果を決定することになる。抗原の投与経路は、得られる免疫応答の強度とタイプに影響を与える。最も一般的な体内への抗原導入経路は、皮下、皮内、筋肉内、静脈内若しくは腹腔内注射又は輸送による組織への注入である。経口投与により抗原は胃腸管に送達され、経鼻投与又は吸引の場合には呼吸管に送達される。

【００７９】

抗体は殆ど全ての生体分子を抗原として認識することができ、この生体分子としては例えば、単なる中間代謝産物や糖、脂質、オータコイド、ホルモンのほか、各種高分子（複合炭水化物やリン脂質、核酸、タンパク質）がある。このうち高分子のみがＢリンパ球を刺激し体液性免疫応答を開始させることができる。ジニトロフェノール等の小さな化学物質が抗体に結合することもあり得るがそれ単独ではＢ細胞を活性化させることはできない（即ち、免疫原性がない）。このような小さな化学物質に対して特異的な抗体を生成させるために、免疫学者は通常これらの物質を高分子に結合させてから免疫感作を行う。この場合、この小さな化学物質を「ハプテン」と呼び、高分子はキャリアと呼ぶ。ハプテン－キャリア複合体は、遊離のハプテンとは異なり、免疫原として作用することができる（ＡｂｂａｓとＬｉｃｈｔｍａｎ、２００３）。同様の又は更に別の免疫感作プロトコールが本技術分野において広く知られているが、適切なストラテジーの選択は本発明を実施する当業者によって容易に行うことができよう。

【００８０】

初回免疫応答後は、通常、導入された免疫原／抗原に対して産生された特異的抗体のレベルとトータル免疫グロブリンレベルとのいずれもが僅かな顕著でない上昇しか示さない。免疫応答の強度は免疫原の投与量に依存する。ある閾量未満では、大部分のタンパク質は全く免疫応答を誘導しない。閾量以上になると、抗原投与量の上昇に伴ってブロードなプラトーレベルに達するまで徐々に上昇し、次いで非常に高い抗原投与量で減少に転じる。一般に、二次及びそれに続く免疫応答はより低い抗原投与量で生じ、より高いプラトー値を達成する。これは免



疫学的記憶のサインである。このことが、特異的抗体の力価を顕著に向上させるために追加免疫感作が通常必要となる理由である。追加免疫感作の回数は幾つかの要因によって異なり、例えば、抗原の免疫原性や免疫学的アジュバントの種類、免疫感作経路、スケジュールによって異なる（Ｓｔｉｌｌｓ、２００５）。

【００８１】

大抵の抗原は非常に複雑であるため、非常に多くのリンパ球によって認識されるエピトープを多数提示している。各リンパ球は活性化されて増殖し形質細胞に分化する。そして、得られる抗体応答はポリクローナル抗体（ＰＡｂ）である。適応免疫応答の重要な特徴は免疫学的記憶である。免疫学的記憶は、一次免疫応答を誘導する初回或いは一次免疫感作の結果として得られる。

【００８２】

多くのタンパク質は、単独で投与した場合には免疫原性に乏しいか又は免疫原性を示さない。タンパク質抗原に対する強い適応免疫応答を得るためには、常に、アジュバントとして知られる混合物と共に抗原を注入する必要がある。アジュバントは、これと混合された物質の免疫原性を向上させる任意の物質である。アジュバントは、免疫原と安定した結合を形成しないという点でタンパク質キャリアと異なる。応答の誘導が弱い又は応答を誘導しない免疫原であっても、これをアジュバントと併用してプライミングすることにより、アジュバントを必須とする免疫原をアジュバント非存在下に追加投与することで実質的な免疫応答が得られる（Ｊａｎｅｗａｙ　Ｊｒ．ら、２００１；ＬｅｅｎａａｒｓとＨｅｎｄｒｉｋｓｅｎ、２００５；Ｌｉｐｍａｎら、２００５；ＭｃＣｕｌｌｏｕｇｈとＳｕｍｍｅｒｆｉｅｌｄ、２００５；ＳｃｈｕｎｋとＭａｃａｌｌｕｍ、２００５；Ｓｔｉｌｌｓ、２００５）。

【００８３】

各免疫感作に対する応答は次第に強くなり、二次応答、三次応答、それ以後の応答と強度が次第に上昇する。増強された免疫状態を達成するために抗原接種を繰り返し行うことは高度免疫感作として知られている。臨床的技法及び免疫化学的技法に用いられる抗体の多くは、適切な動物（げっ歯類、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ等）に適切な抗原の懸濁物を高度免疫感作させて作られるポリクローナル抗体である。抗体産生ピーク時に血清を回収することにより、本法により特異的免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）濃度が約１～１０ｍｇ／ｍＬの血清を得ることができる。モノクローナル抗体（ｍＡｂ）は十分に特性評価された低免疫原性源であると共に非常に有効なツールであることが示されているものの、ポリクローナル抗体には依然として利用価値がある。病原体に対する応答時に自然免疫系がｍＡｂではなくポリクローナルを用いていることから分かるように、ポリクローナル抗体も受動免疫治療に好ましい場合が多い。ポリクローナル抗体

33

の利点としては、免疫複合体形成によりそれらの能力が高められることがあること、種々の病原体株により引き起こされる感染症又は成功裏に治療を行うために多数のエピトープを中和する必要のある感染症に対抗できること、が挙げられる。一般に、ポリクローナル抗体は比較的調製し易く、調製費用もかなり廉価であることから免疫化学的技法においても有利である。また、ポリクローナル抗体は様々な種（ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ロバ、トリ等）に産生させることができるので、実験設計における多くのオプションを使用者に与える。しかしながら、ポリクローナル調製物中の特異的抗体の量がトータル抗体タンパク質のごく一部に過ぎない場合もある。そのため、抗体製造における第１の目的は、力価と親和性が高い抗血清を得ることである。

【００８４】

本技術分野において広く用いられている高度免疫感作プロトコールでは、高ＩｇＧレベルの維持には定期的な追加免疫感作が必要である。これは、ＩｇＧ代謝研究のごく初期段階において既に示されているように（ＡｎｄｅｒｓｅｎとＢｊｏｒｎｅｂｏｅ、１９６４）、通常の動物では免疫グロブリンの異化作用が上昇するからである。これに対して、本発明は免疫グロブリン産生が安定的に向上されたレベルを達成する、より効率的なプロトコールを提供するものであり、これは、追加の免疫感作を全く行わない又は回数のより少ない免疫感作でも、高ＩｇＧレベルを比較的長期間維持させるものである。

【００８５】

ポリクローナル抗体の製造では、免疫学的結果や動物に与える痛みや苦痛等、動物実験の結果に影響し得ると考えられる重要なステップを多く認めることができる。抗体を誘導させるための抗原が免疫原性に乏しい場合、効果的な免疫応答を誘導する刺激剤が免疫系に必要である。アジュバントはこの目的のために使用することができ、免疫応答をより強い細胞性又は体液性応答に向かわせる。１００種類を超えるアジュバントが報告されているが、ポリクローナル抗体の製造に通常使用されるアジュバントはごく僅かしかない（例えばフロイント完全アジュバント（ＦＣＡ）、フロイント不完全アジュバント、アルミニウム塩、Ｑｕｉｌ　Ａ、Ｉｓｃｏｍｓ、Ｍｏｎｔａｎｉｄｅ、ＴｉｔｅｒＭａｘ（登録商標）、ＲＩＢＩ（登録商標））。ＦＣＡは、ほぼ全ての種類の抗原と用いて高抗体価を誘導できることから、ポリクローナル抗体の産生によく使用される。しかしながら、ＦＣＡ、ＴｉｔｅｒＭａｘ、ＲＩＢＩ等のアジュバントを注射した後、重大な副作用が見られたことを報告している研究者も多い。病理学的変化の重篤度はアジュバントのみならず用いた抗原の種類にも依存する。更には、これらに代わるアジュバントは効果的な抗体応答を誘導しない場合が多い。注射量がまた、生じた病変部の程度に影響することが分かっている（ＬｅｅｎａａｒｓとＨｅｎｄｒ

34

ｉｋｓｅｎ、２００５）。これらに基づき本発明は、最適な免疫応答を得つつ動物の痛みや苦痛を軽減させることから、経済的価値を超えて動物福祉という観点からも非常に有益なものとなる、免疫感作回数をより少なくすることができる効率的プロトコールを提供する。

【００８６】

従って本発明は、ポリクローナル免疫グロブリンの製造を可能とする確立された任意の免疫感作プロトコールに従って、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用することを含む、ポリクローナル免疫グロブリンの製造方法を提供する。トランスジェニック動物は好ましくは、ポリクローナル抗体産生に有用な系統又はポリクローナル抗体産生により適するように遺伝子的に改変された系統から得られる。

【００８７】

更に好ましい実施形態においては、本発明は、本発明に係る方法、使用又は動物により産生されるポリクローナル抗体を提供する。本発明に従って産生される抗体は、粗製又は部分精製済み抗体含有血清調製物を標準的な分子生物学的技法により分析することにより、本発明に従って産生されていない調製物と明確に区別することができる。これは例えば、分析対象である血清中の小ゲノムＤＮＡ断片におけるＦｃＲｎ重鎖のコピー数又は種特異性を判定し、知られた同一種の非トランスジェニック対照動物から得られる対照血清サンプルと比較することにより行うことができる（ＥｍａｎｕｅｌとＰｅｓｔｋａ、１９９３；ＬｉｎとＦｌｏｒｏｓ、２０００；ＳａｎｄｆｏｒｄとＰａｒｅ、１９９７）。

【００８８】

ＰＡｂとは対照的に、モノクローナル抗体（ＭＡｂ）は単一のＢリンパ球クローンにより産生される抗体である。１９７０年代半ば、ＫｏｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎは所望の特異性を有するモノクローナル抗体の調製技法を考案してノーベル賞を受賞した（ＫｏｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５）。ＭＡｂ分野で蓄積された数十年に亘る実践と経験とにより、当業者はモノクローナル抗体の製造におけるあらゆる側面において十分に習熟している。特定の抗原に特異的なモノクローナル抗体を製造するために、マウス、ラット又はウサギを該抗原で免疫し、該動物の脾臓細胞やリンパ節リンパ球、他の抹消血リンパ球、他の組織のリンパ球としてＢ細胞を得ることができる。ホスト哺乳動物に対して追加の免疫感作を行い、所望の抗原に特異的なＢ細胞集団を増加させることができると共に抗原特異性を向上させることもできる。これらのＢ細胞は単離後、適切な不死化細胞株と融合される。ミエローマ様細胞はミエローマ様ではない細胞に比べてより効率的に融合する傾向があると共に安定なハイブリッドを生じることから、ミエローマ株はＢ細胞の融合パートナーとして最適である。不死化細胞は、ミエローマ細胞等の形質細胞腫細胞又はリンパ芽球様細

35

胞であり、これは抗体産生細胞であると同時に悪性化している。ハイブリドーマの上清をスクリーニングし、所望の抗原結合性を有する最適なハイブリドーマを選択する。選択したハイブリドーマをクローニングし凍結保存する。

【００８９】

このコンテキストにおいては、モノクローナル抗体に関し、動物とは任意の非ヒト動物を意味し、例えばウサギ、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ブタ、ウシが挙げられるが、これらに限定されない。本発明では更に、リンパ系細胞株を産生するために用いられる数種のトランスジェニック動物を含む。

【００９０】

従来の又は古典的な技法の他に、組み換え技術の使用によりポリクローナル、モノクローナル抗体製造の新時代の幕が開け、これにより現在では抗体を設計することが可能となっている（抗体を機能的サイズにしたり、ヒト化抗体を製造するなど）（Ｌｏｎｂｅｒｇ、２００５；Ｐｅｔｅｒｓｏｎ、２００５）。

【００９１】

従って本発明は、モノクローナル免疫グロブリンの製造を可能とする確立された任意の免疫感作プロトコールに従って、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用することを含む、モノクローナル免疫グロブリンの製造方法を提供する。トランスジェニック哺乳動物は、モノクローナル抗体産生に有用な系統又はモノクローナル抗体産生により適するように遺伝子的に改変された系統から得ることが好ましい。

【００９２】

更に好ましい実施形態においては、本発明は、現在の技術水準のプロトコールに従って本発明に係る動物から得られる細胞から産生されるか、又は本発明に係る方法若しくは使用に従って作製される若しくは使用される動物から得られる細胞から産生されるハイブリドーマ細胞株を提供する。モノクローナル抗体はまた、本発明の方法、使用又は動物により産生される。

【００９３】

本明細書において「トランスジェニック動物」という表現に含まれる「トランスジェニック」という用語は、通常行われる交雑又は交配では得られない遺伝子又は他の核酸配列を含む動物を意味する。「遺伝子」という用語は、ｍＲＮＡ、機能性ＲＮＡ又は特定のタンパク質を発現する、調節配列を含む核酸断片を意味する。「ネイティブ遺伝子」という用語は、天然に存在する遺伝子を意味する。「トランスジーン」という用語は、形質転換によりゲノムに導入され安定に維持される遺伝子を意味する。このコンテキストにおいて「形質転換」という用語は、本明細書中、外来ＤＮＡを細胞に導入するという意味で広義に用いられる。この用語はまた、マイクロインジェクションやトランスフェクション、インフェクション、トランスダクション、ドナー細胞とアクセプター細胞の融合など、外来ＤＮＡを細胞に導入する他の機能的に等価な方法をも包含することを意図している。トランスジーンは例えば、形質転換されるべき特定の動物の遺伝子と相同又は非相同な遺伝子である。更にトランスジーンは、非ネイティブ生物に挿入されたネイティブ遺伝子、即ちキメラ遺伝子も含む。「内因性遺伝子」という用語は、ある生物のゲノム中において本来あるべき部位に位置しているネイティブ遺伝子を意味する。

【００９４】

トランスジーンのレシピエント動物への導入は、通常、目的のトランスジーンを有する遺伝子構築物を用いることによって行われる。本明細書において「遺伝子構築物」という用語は、レシピエント細胞へ導入された時に発現する核酸配列を有する人工的に作られたリコンビナントＤＮＡを含むことを意図している。遺伝子構築物はコード配列と調節配列を含むことができる。「コード配列」という用語は、特定のアミノ酸配列をコードし且つ非コード配列は含まないＤＮＡ又はＲＮＡ配列を意味する。「調節配列」という用語は、コード配列の上流（５’非コード配列）、内部又は下流（３’非コード配列）に位置し、その転写、ＲＮＡプロセシング又は安定化、該コード配列の翻訳に影響を与えるヌクレオチド配列を意味する。調節配列としては例えば、エンハンサーやプロモーター、翻訳リーダー配列、イントロン、ポリアデニル化シグナル配列がある。これらには、天然の配列、合成された配列のほか、合成配列と天然配列の組み合わせた配列も含まれる。本発明に有用な調節配列としては、構成的プロモーター、組織特異的プロモーター、発生段階特異的プロモーター、誘導性プロモーター、ウィルスプロモーターを挙げることができるが、これらに限定されない。

【００９５】

「プロモーター」という用語は、ＲＮＡポリメラーゼと適切な転写に必要な他の因子とが認識する部位を与えることによりコード配列の発現を制御する、通常コード配列の上流（５’）に存在するヌクレオチド配列を意味する。「プロモーター」という用語は、ＴＡＴＡボックスと、発現制御のための調節因子が付加される転写開始部位を特定する他の配列とから通常構成される短いＤＮＡ配列であるミニマムプロモーターを含む。「プロモーター」はまた、コード配列又は機能性ＲＮＡの発現を制御可能な調節エレメントがプラスされたミニマムプロモーターを含むヌクレオチド配列も意味する。この種のプロモーター配列は、近位及びより遠位の上流エレメントから成り、後者のエレメントをエンハンサーという。従って「エンハンサー」とは、プロモーター活性を刺激することができるＤＮＡ配列であり、プロモーターが本来有しているエレメントか、又はプロモーターのレベル或いは組織特異性を向上させるために挿入された異種エレメ

ントのいずれであってもよい。
エンハンサーはいずれの方向（正常方向又は逆方向）にも作用することができ、プロモーターの上流と下流のいずれにおいても機能することができる。エンハンサー及び他の上流プロモーターエレメントはいずれも、これらの作用を仲介する配列特異的ＤＮＡ性結合タンパク質に結合する。プロモーターは、その全体がネイティブ遺伝子由来であってもよいし、天然に存在する各種プロモーターに由来する種々のエレメントから構成されていてもよいし、更には合成ＤＮＡセグメントから構成されていてもよい。プロモーターはまた、生理学的状態又は発生状態に対応して転写開始の有効性をコントロールするタンパク質因子の結合に関わるＤＮＡ配列を含んでいてもよい。転写制御はまた、各種化学物質、ホルモン、誘導因子等の存在に依存して行われてもよい。当業者であれば、特定用途に最も適した調節配列の選択及び作製は容易に行うことができよう。

【００９６】

トランスジェニック技術は、科学研究に広く用いられており数種のプロトコールが確立されている。本発明は、本発明のＴｇ動物が作製される限りにおいては、ある特定の変更を選択することで何ら限定されるものではない。従来のトランスジェニック技法の問題点に関し、本技術分野において幾つかの報告がなされているが、トランスジーンの発現レベルは種間で異なり（Ｐａｌｍｉｔｅｒら、１９８４）、同一種内でも動物によって異なることがあり（Ｄｏｂｉｅら、１９９６；Ｓｕｔｈｅｒｌａｎｄら、２０００）、特にゲノム断片ではなくｃＤＮＡを用いた場合にはこうした現象が顕著に見られる。トランスジーンの発現の多様性はホストゲノムへの組み込み位置によるものであり、トランスジーンの発現を不安定なものとする（Ｏｐｓａｈｌら、２００３）。プラスミドを用いたトランスジーンのマイクロインジェクションの問題点は、ＹＡＣ（酵母人工染色体）やＢＡＣ（細菌人工染色体）、ＰＡＣ（Ｐ１ファージ人工染色体）等のサブメガベースのＤＮＡを収容するクローニングシステムを用いることによって克服することができる。これらの技法はＴｇマウスの作製において十分に確立されている（（ＧｉｒａｌｄｏとＭｏｎｔｏｌｉｕ、２００１）参照）。当業者であれば、現在の技術水準と本明細書に記載の教示に基づいて、本発明のＴｇ動物の作製及び特性評価に必要なステップを実施することができよう。

【００９７】

好ましい実施形態においては、本発明に係る遺伝子構築物は、ウシＢＡＣクローン＃１２８Ｅ０４のインサートを含む。ＢＡＣクローン＃１２８Ｅ０４は、高級ホルスタイン雄牛の雄性胎児の生殖隆起由来ＤＮＡから作製されたウシＢＡＣライブラリーのクローンである（ＩＮＲＡウシＢＡＣライブラリーより取得）（Ｅｇｇｅｎら、２００１）。クローン＃１２８Ｅ０４のインサートは、



２００７年８月１１日現在のＮＣＢＩ Ｍａｐ Ｖｉｅｗｅｒ、ボスタウラス（ウシ）Ｂｕｉｌｄ ３．１（Ｂｔａｕ ３．１）に示される、ウシゲノムの第１８番染色体のスクレオチドポジション５３５４３８５２～５３６５２０２４のセグメントとして定義される。

【００９８】

好ましい実施形態においては、本発明に係る遺伝子構築物は、ウサギＢＡＣクローン＃２６２Ｅ０２のインサートを含む。ＢＡＣクローン＃２６２Ｅ０２はウサギＢＡＣライブラリーから単離された（Ｒｏｇｅｌ－Ｇａｉｌｌａｒｄら、２００１）。ＢＡＣライブラリーはｐＢｅｌｏＢＡＣｌｌベクター中に構築され、この高分子量ＤＮＡはニュージーランドウサギの白血球細胞から調製された。ウサギＢＡＣライブラリーは、家畜のためのＩＮＲＡリソースセンターにより取扱われており公的に入手可能である。

【００９９】

本発明のＴｇ動物における特定の変更は、それがＦｃＲｎ活性を有するタンパク質のα鎖をコードする遺伝子を過剰発現させるものである限り、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本明細書において「過剰発現」という用語は、ある種における着目した遺伝子のコピー数が２である場合に予想されるよりも高い発現レベルを意味する。
過剰発現は、発現レベルが向上した結果生じるＦｃＲｎ機能の変化が、野生型動物における基本の発現レベルと比較することにより検出可能である限り、生化学的プロセスの内の幾つかのレベル、例えば転写レベルや翻訳レベル、翻訳後の修飾レベルで評価することができる。例えば、本発明の幾つかの実施例で示されるように、着目する遺伝子によってコードされるタンパク質の発現量が上昇すれば、ＦｃＲｎ活性を有するタンパク質のα鎖の合成量が上昇したことになる。

【０１００】

過剰発現は、分子生物学分野の当業者によく知られた数種の手段により達成することができる。目的遺伝子を過剰発現させる方法としては、例えば、該遺伝子のコピー数を増加させる、プロモーター領域の結合強度を上げる、エンハンサーエレメントをアップレギュレートする、又は反対にリプレッサーエレメントを阻害又はブロックすることなどが挙げられる。

【０１０１】

本発明の好ましい実施形態においては、過剰発現は組み込み部位に依存せずに組み込みコピー数に依存する。しかしながら当業者であれば、トランスジーンの発現を抑制する入手可能な遺伝的エレメントを使用することが有利となる又は必要となる時期を決めることができよう。誘導性調節エレメントの例としては、目的遺伝子の微妙な発現調節を可能とする、組織や器官、発生段階等に依存的な調節エレメントのほか、先行技術に多数報告され

39

ていると共に当業者により自由に使用され得るものであり、これらを用いて本発明を実施することができる。

【０１０２】

本発明の更に好ましい実施形態においては、過剰発現は、目的遺伝子の一個より大の機能的コピーを本発明のＴｇ動物のゲノムに組み込むことにより達成される。好ましくは、ＦｃＲｎα鎖遺伝子を含むＤＮＡ断片を動物から単離する。このような大きなＤＮＡ断片は、非ヒト動物のゲノムＤＮＡから調製されるコスミド、ＹＡＣ、ＢＡＣ等のライブラリーをスクリーニングすることにより単離することができる。ＹＡＣクローンは最大２メガベースまでのＤＮＡ断片を保持することができ、ＢＡＣクローンはこれより小さいサイズのＤＮＡ断片（約１５０～２５０ｋｂ）を保持することができる。ソースとなる動物は如何なる種のものでもよく、例えば、市販のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の製造に重要な役割を果たしている動物（マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ブタ、ロバ、ウマ等）とすることができる。トランスジーンのソースの選択が限定されないことは明らかであり、本発明に係る方法に用いる遺伝子として適しているかどうかを、当業者であれば、本明細書に与える教示に基づき判断することができる。

【０１０３】

レシピエント動物へのトランスジーンの導入手続及びＴｇ動物の選択手続は当業者によく知られている。簡潔に記載すれば、ＦｃＲｎα鎖遺伝子を有するトランスジェニックベクターを一個又は複数個のレシピエント細胞に導入し、次いで、ランダムインテグレーション又はターゲットインテグレーションによりこの一個又は複数個のレシピエント細胞のゲノムに組み込む。ランダムインテグレーションの場合には、標準的なトランスジェニック技術によりＦｃＲｎ遺伝子座を含むトランスジェニックベクターを動物のレシピエント細胞に導入することができる。例えば、トランスジェニックベクターを受精卵母細胞の前核に直接注入することができる。トランスジェニックベクターはまた、卵母細胞との受精前に精子をトランスジェニックベクターとコインキュベーションすることにより導入することもできる。トランスジェニック動物は受精卵から発生させることができる。

【０１０４】

トランスジェニックベクターを導入する別の方法はレンチウィルスによる遺伝子組み換えである。この最近開発された方法－トランスジーンのサイズという観点からは制約があるが－は、マウスやラット、ブタ等のあらゆる種のＴｇ動物の作製において非常に効率的であることが示され、遺伝子治療ストラテジーの発展において特に有望なツールである（Ｐｆｅｉｆｅｒ、２００６）。トランスジェニックベクターを導入する更に別の方法は、胚性幹細胞をトランスフェクトした後、この遺伝子的に改変された胚性幹細胞を発生途中の胚に注入することによるものである。最終的に、Ｔｇ動物の少なくとも一部の体細胞のゲノム中にＦｃＲｎトランスジーンが組み込まれた胚からキメラＴｇ動物が作製される。

ターゲットインテグレーションの場合には、トランスジェニックベクターを適切な動物レシピエント細胞、例えば胚性幹細胞又は既に分化した体細胞に導入することができる。

【０１０５】

特定の実施形態においては、トランスジーンの組み込みを行った結果、相同組み換えによって対応する内因性ＦｃＲｎα鎖遺伝子座が失われることがある。或いは、ネイティブＦｃＲｎ遺伝子座がトランスジーンの導入とは独立してノックアウトされることもある。

例えば、ノックアウトされた遺伝子型の親を用いて古典的な交雑と交配を実施することにより所望の動物が得ることができる。しかしながら、内因性ＦｃＲｎ遺伝子座の置換は本発明の目的を達成するためには必須ではない。当業者であれば、内因性遺伝子の存在が免疫グロブリン産生量の向上に不利益をもたらすか否かを判断することができよう。しかしながら、ＦｃＲｎ活性を有するタンパク質のα鎖をコードする遺伝子を過剰発現させるために、該遺伝子のコピーが多数挿入されている場合、通常環境下では、そのような置換に関するストラテジーの必要性はないと考えられる。

【０１０６】

内因性ＦｃＲｎα鎖由来のＦｃＲｎよりも外因性ＦｃＲｎα鎖由来のＦｃＲｎに対してより強く結合する特異的ＩｇＧアイソタイプを増加させる必要がある場合には、内因性ＦｃＲｎを欠損（ノックアウト）させる及び／又はこれを外因性ＦｃＲｎα鎖と置換することが好ましい。重要な例として、ヒト免疫グロブリン遺伝子の重鎖と軽鎖をコードするヒト染色体ＤＮＡを保持したＴｇ動物におけるヒトＩｇＧの過剰生産が挙げられる。ウシＦｃＲｎα鎖等を過剰発現する動物においてホストＦｃＲｎα鎖を欠損させることは、外因性ＦｃＲｎα鎖との結合が弱く動物体内からの排出が早いホストＩｇＧを引換えにして、ヒトＩｇＧを増加させるのに有効であると予測できる。同様の例としては、ある種のホストＩｇＧアイソタイプが他のＩｇＧアイソタイプと引換えに良好に増加する場合が挙げられる。

【０１０７】

細胞を選択した後、除核済み核移植単位細胞（例えば卵母細胞）と融合させることができる。融合は、本技術分野において十分に確立された従来技法に従って行う（例えばＣｉｂｅｌｌｉら、１９９８参照）。また、母細胞の除核と核移植は、注入ピペットを用いたマイクロサージェリーにより行うことができる（例えば、Ｗａｋａｙａｍａら、１９９８参照）。次いで、得られた卵細胞を適切な培地中で培養し、Ｔｇ動物作製のための同調させたレシピエントに移植する。或いは、遺伝子的に改変さ

40

れた胚性幹細胞を選択し、発生途中の胚に注入することもできる（この胚は後にキメラ動物となる）。

【０１０８】

本発明の好ましい実施形態は、Ｔｇ動物がトランスジーンのコピーを複数有している場合である。理論的には、本発明のＴｇ動物に導入されるトランスジーンのコピー数に関し考えられる限定はない。当業者であれば、ＦｃＲｎ活性を有するタンパク質のα鎖をコードする遺伝子の過剰発現が、本発明の有利な効果が得られる一方で細胞の恒常性と機能性を損ないかねない極めて集中的な遺伝子発現とはならない、相対的に高いＦｃＲｎ発現であるかどうかを容易に判定できよう。本明細書に示す実施例においては、完全ｂＦｃＲｎ遺伝子を最大１０コピー有する動物の各種Ｔｇ系統間に表現型の変化は観察されなかった（Ｂｅｎｄｅｒら、２００７）。更にＬｕらは（Ｌｕら、２００７）は、乳腺特異的プロモーターの下流にｂＦｃＲｎのｃＤＮＡを最大１５コピー有するが顕著な表現型変化を伴わないＴｇ系統についてのデータを示した。

【０１０９】

本明細書において「ＦｃＲｎ活性」という用語は、インビボで生じる一連のイベントを示すのに用いられる。現在の技術水準に関する記載において既に述べたように、ＦｃＲｎは、新生児の腸を介して母体から新生児に母性免疫グロブリンを伝達する受容体としてげっ歯類で初めて同定され、その後、種々の研究により、各種起源の細胞内及び細胞間でのＩｇＧ輸送の調節においてＦｃＲｎが中心的役割を果たしていることが示された。本明細書のコンテキストにおいては、「ＦｃＲｎ活性」という用語は主にＩｇＧが分解されないようにすることを意味する。従って、本明細書においてＦｃＲｎの活性はＩｇＧ－Ｆｃ結合能とＩｇＧ分解保護能と定義される。

【０１１０】

更に、本明細書で初めて開示されるように、本明細書中に用いられる「ＦｃＲｎ活性」という用語はまた、ＦｃＲｎの体液性免疫応答向上能、より詳細には、ＩｇＭとＩｇＧの合成促進をもたらす抗原特異的クローン性Ｂ細胞増殖促進能も意味する。

【０１１１】

ＦｃＲｎ活性は、例えば、そのメカニズムが血管の内側を覆う内皮細胞により主に仲介されていると考えられている、ＩｇＧ保護プロセスの一以上のステップで判定することができる。これらの細胞内において、ＦｃＲｎは主に初期／リサイクルエンドソーム中に存在し、ここで液相エンドサイトーシスにより取込まれたＩｇＧと遭遇する。エンドソーム内の酸性環境により相互作用が促進され、結合したＩｇＧとアルブミンは再度表面に戻され細胞から放出されるが、結合しなかったリガンドは下流に送られリソソームによる分解を受ける。

【０１１２】



しかしながら、これらのステップの幾つかは、その用語の一般的な意味とは離れてモデル化及び定義をすることができる。

【０１１３】

着目するＩｇＧのＦｃＲｎに対する結合能、又はＩｇＧ定常部若しくはそのＦｃ断片を含む分子のＦｃＲｎに対する結合能は種々のインビトロアッセイにより評価することができる。ＷＯ９７／３４６３１に種々の方法が詳細に開示されているが、この内容の全体を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する。

【０１１４】

ＩｇＧ－ＦｃＲｎ間の結合を判定するための方法としては、例えば、約ｐＨ６でＩｇＧ－Ｆｃをインビボで結合する機能を保持している、β２ｍとＦｃＲｎとの単離複合体を利用するインビトロアッセイがあり、結合したＩｇＧ－ＦｃはｐＨが約７．２にシフトすると解離する。ｐＨに関して本明細書中に用いられる「約」という用語は、その値から±０．２のｐＨ値を意味する。ＦｃＲｎ／β２ｍ複合体は、マイクロタイターウェルやフィルター、メンブラン、カラム、ビーズ等の固体支持体に結合させる。固体支持体によく用いられている材料は、ナイロン、ポリスチレン、ポリプロピレン、アガロースである。一般に、分子成分の接触は、通常適切に緩衝化された水溶液中に各成分を添加し、これら成分を互いに所定時間反応させることにより行われる。アッセイの構成によっては、異なる成分の添加と添加の間に洗浄工程が必要となる場合もある。これらの成分は、各成分間で生じる結合の判定に役立ち、競争的結合アッセイや直接的結合アッセイ、サンドウィッチアッセイ等の幾つかのよく知られたアッセイフォーマットに従って設定することができる。

必要な結合工程が全て終了した後、本技術分野で通常用いられる技法、例えば放射性シグナル、酵素的シグナル、蛍光シグナル又は他のよく知られたシグナルを検出することにより検出を行う。測定されたシグナルは、比例的（例えば直接的結合アッセイの場合）又は競争的なものである。

【０１１５】

ＩｇＧ－ＦｃＲｎ間結合を判定するための一般化された方法を、目的のＩｇＧに結合する理想のＦｃＲｎヘテロダイマーを形成する、適切なＦｃＲｎα鎖及び／又はβ２ｍ対を同定するために好適に適用することができる。この場合、様々な種に由来するＦｃＲｎα鎖又は突然変異の結果もたらされるＦｃＲｎα鎖と、目的のＩｇＧに高親和性で結合するβ２ｍとが試験に用いられる。先ず、ＦｃＲｎと結合することが知られているＩｇＧ（例えば、ｂＦｃＲｎに対するヒトＩｇＧ）を結合に適した条件下で用いる。この初期設定に続き元のＦｃＲｎα鎖を、異なる種のＦｃＲｎα鎖又はインビトロにおける突然変異誘発により生成されるＦｃＲｎα鎖で置換し、対象

43

となるＩｇＧへの結合性についてアッセイする実験を行う。得られた複合体の結合親和性を元の結合複合体と比較することにより、最適のＦｃＲｎα鎖を同定することができる。同様の方法を用いることにより、所定のＦｃＲｎα鎖と対を形成すべき最適と考えられるβ２ｍを見出すことができる。これに加えて又はこれに代えて、複数対のＦｃＲｎα鎖－β２ｍ組合せ物を同時に試験するハイスループット技法を用いることができる。インビボにおけるＩｇＧ－Ｆｃ結合能を保持しているＦｃＲｎ－β２ｍ単離複合体は、各タンパク質をコードする設計された核酸を用いてインビトロ合成により製造することが好ましい。各タンパク質は別々に合成した後、共存させ複合体を生成させることができる。各タンパク質をコードするＤＮＡセグメントは、組み換えベクター中、該ベクターのタンパク質発現を可能とする位置に導入することできる。例えば、制限エンドヌクレアーゼを用いた遺伝子工学によるこのようなＤＮＡセグメントの操作技法は、本開示内容と参考文献（（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９８）等）とから当業者にはよく知られている。当業者は、すぐ上に述べたインビトロでの方法に適する複合体の生成に使用することができる別の方法が存在することを認識している。或いは、適切な細胞源から内因性複合体成分を単離することもできる。

【０１１６】

目的のＩｇＧのＦｃＲｎに対する親和性は、先に記載されているように（Ｋａｒｌｓｓｏｎら、１９９１；Ｐｏｐｖら、１９９６）、例えばＢＩＡｃｏｒｅ２０００（ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を用いた表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）測定により測定することができる。この方法においては、ＦｃＲｎ分子をＢＩＡｃｏｒｅセンサーチップ（例えばＣＭ５チップ（ファルマシアより入手））に結合させ、固定化したＦｃＲｎに対するＩｇＧの結合性を一定の流速で測定し、ＢＩＡ評価２．１ソフトウェア（ＢＩＡ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　２．１　ｓｏｆｔｗａｒｅ）を用いてセンサーグラムを得、これに基づきＦｃＲｎに対する、目的のＩｇＧ、定常部又はその断片の結合率と解離率を算出することができる。

【０１１７】

また、目的のＩｇＧ又はその断片のＦｃＲｎに対する相対的親和性は、競争的結合アッセイ等によっても測定することができる。目的のＩｇＧを、ＦｃＲｎが固定化された９６ウェルプレートの各ウェルに量を変えて添加する。次いで、各ウェルに放射線ラベルした目的のＩｇＧを一定量添加する。結合が見られた画分の放射能パーセントを野生型ＩｇＧの量に対してプロットすることで、その相対的親和性を曲線の傾きから算出することができる。更に、目的のＩｇＧ又はその断片のＦｃＲｎに対する親和性は、飽和度の研究（ｓａｔｕｒａｔｉｏｎ　ｓｔｕｄｙ）及びスキャッチャード解析その他の手段（例えば、非線形回帰（曲線適合）計算）によって測定可能

44

である。

【０１１８】

目的のＩｇＧ又はその断片がＦｃＲｎによって細胞内を横断的に運搬されることは、放射線ラベルＩｇＧ又はその断片とＦｃＲｎ発現細胞とを用い、細胞単層の一方の側と他方の側における放射活性を比較するインビトロトランスファーアッセイにより測定することができる。

【０１１９】

インビボにおいてＩｇＧを保護していることに基づきＦｃＲｎを同定する他のアッセイは、細胞培養アッセイである。ＦｃＲｎを機能的に発現している培養物中の哺乳動物細胞は、既に存在している哺乳動物細胞から生じている細胞であるか又はこれから同定される細胞である。このアッセイでの使用に適した細胞はＩｇＧを異化することができる細胞であり、これら細胞内のＦｃＲｎの発現によりこの異化作用が低減されるものである。インビボアッセイのコンテキストにおいて言及されるＦｃＲｎの機能的発現とは、ＦｃＲｎα鎖－β２ｍ複合体が目的のＩｇＧに結合し、結合したＩｇＧを分解から保護することを意味する。適切なＦｃＲｎα鎖を同定するためには、目的のＩｇＧを種々のＦｃＲｎα鎖を発現している一連の細胞に接触させる。細胞は、正常な細胞機能に適切であり且つそれに資する条件下でインキュベートした後、ＩｇＧ異化作用についてアッセイを行う。ＦｃＲｎを発現していない対照細胞におけるＩｇＧ異化作用と比較してＦｃＲｎ発現細胞におけるＩｇＧ異化作用の実質的な減少は、対象のＦｃＲｎα鎖がＩｇＧを保護していることの指標となる。このアッセイはＩｇＧへの結合、取込み、保護を介してＦｃＲｎの機能を検出する。本技術分野で知られた細胞株、そして免疫感作時に抗体を産生して選択される種の初代細胞もまた、細胞培養アッセイに用いることができる。このアッセイは、ＩｇＧへの結合に優れた細胞外部分と、免疫感作に用いられる種に特異的な膜貫通細胞質性セグメントとから構成されたハイブリッドＦｃＲｎα鎖分子の試験に重要である。

【０１２０】

現在の技術水準に関する記載において既に触れたように、ＦｃＲｎは、ＭＨＣクラスＩ様α鎖とβ２－ミクログロブリン（β２ｍ）から構成されるヘテロダイマー分子である。

ＦｃＲｎα鎖（認められているシンボル：ＦＣＧＲＴ、認められている名称：Ｆｃ受容体、ＩｇＧ、α鎖トランスポーター、Ｆｃ断片免疫グロブリンＧ受容体；新生児型Ｆｃ受容体、ＦｃＲｎアルファ鎖）はその特異的な性質を分子に付与し、一方でβ２ｍは幾つかの異なるタンパク質複合体に遍在する成分である。当業者には明らかではあるが、本発明の方法を実施するためには、このヘテロダイマーの両サブユニットが十分量存在している必要がある。上述のように、免疫グロブリンの産生レベルを向上させる本発明の決定的な特徴は、ＦｃＲｎ分子の

45

α鎖をコードする遺伝子を過剰発現させることである。しかしながら、機能性ＦｃＲｎを生産するためには、他方の鎖であるβ２ｍが等モル量必要であることは明らかである。従って、本発明の実施に当たり、β２ｍの細胞内利用性について当業者は考慮しなくてはならない。Ｔｇ動物に対して行われた遺伝子的改変に基づくＦｃＲｎヘテロダイマーの期待されるレベルと、実際に測定されるＦｃＲｎ活性との間の相関関係は、β２ｍの供給が不十分であることに起因する種々の問題の指標となる。これら両因子の評価方法は、当業者に利用可能であると共に本明細書にも記載されている。また必要に応じて、当業者であれば現在のトランスジェニック手法等を利用することによりβ２ｍレベルを上昇させることができる。特定の実施形態においては、同一又は異なる遺伝子構築物から及び／又はこれによって、ＦｃＲｎα鎖とβ２－ミクログロブリン鎖の双方を同時に過剰発現するＴｇ動物を提供することにより本発明を更に向上させることができる。

【０１２１】

ＦｃＲｎ活性について上で述べたセクションから明らかなように、ヘテロダイマーの組成はその活性を左右する重要な因子となり得る。従って本発明は、本発明に係るＴｇ動物の免疫グロブリン血清レベルを上昇させるために、α鎖とβ２ｍの所望の組合せを提供することができる。ＦｃＲｎの結合特性及び特異的親和性については上で詳述したが、ＦｃＲｎヘテロダイマーのこれらの性質はまたそのサブユニットの組成によっても決定される。先行技術の記載で述べたように、ウシＦｃＲｎとヒトＩｇＧ間の結合強度はヒトＦｃＲｎとヒトＩｇＧ間よりも高い。従って、Ｔｇ動物のネイティブなＦｃＲｎ分子よりも良好な結合特性を有するＦｃＲｎ分子を提供することは本発明の重要なアスペクトである。特に、この目的は、本発明のＴｇ動物における免疫グロブリン産生に最善と考えられる、ＦｃＲｎのα鎖とβ２ｍの組み合わせを試験選択することにより達成することができる。これは、異種又は同一種由来のβ２ｍ又は適切なα鎖を導入することにより達成することができる。当業者であれば、本明細書に詳述される結合特性の判定を行った後、本発明のＴｇ動物に必要な変更を加えることができよう。従って、本明細書において本発明のＴｇ動物に言及する場合、ＦｃＲｎ活性を有するタンパク質のα鎖をコードする遺伝子を含むだけでなく、必要に応じて、ＦｃＲｎ活性を有するタンパク質のα鎖をコードする遺伝子に加えβ２－ミクログロブリンをコードする遺伝子も含む動物を意味することが意図されている。

【０１２２】

また、β２ｍをコードする遺伝子構築物を非ヒト動物に導入することによりＦｃＲｎ活性を向上させることも本発明の範囲内である。当業者であれば、この活性向上を達成するのに必要な条件を決定することができよう。Ｆ

46

ｃＲｎのα鎖に関して述べたことはいずれも、β２－ミクログロブリン（β２ｍ）の改変に適宜変更して適用される。

【０１２３】

また、改変の結果、上述した活性に関する要件を満たす機能性ＦｃＲｎ分子が得られる限り、α鎖又はβ２ｍの突然変異体を用いることも本発明の範囲内である。突然変異技術は分子生物学の当業者によく知られている。しかしながら、適切なＦｃＲｎタンパク質を決定するためには、活性に関する要件に代えて、突然変異体とネイティブタンパク質間に構造的相同性を確立し、これを利用することができる。ここで構造的相同性は、本発明に係るトランスジーンの特性評価のための利用可能な特徴ではあるが、これに限定されるものではないことを強調しておく。このＦｃＲｎタンパク質のα鎖は、本発明の教示に従って用いられるウシＦｃＲｎタンパク質の配列と約６０％以上の配列同一性を有する。本明細書において「配列同一性」、「相同性」、「バリアント」という用語は相互交換可能に用いられる。あるアミノ酸が他のものと相同であるという場合には、対象となるあるアミノ酸配列の他の配列に対する配列同一性が少なくとも６０％、好ましくは少なくとも７０％、より好ましくは少なくとも８０％、更により好ましくは少なくとも９０％、また更により好ましくは少なくとも９５％であることを意味する。配列が例えば少なくとも６０％同一であるかどうかを決定するためには、ＥＭＢＬのＦａｓｔＤＢプログラム又はＳＷＩＳＳＰＲＯＴデータベースを用いることができる。本技術分野でよく知られた他のアルゴリズムとそのコンピュータ化された形態もまた、この相同性の決定に用いることができる。

【０１２４】

特定の実施形態においては、ＦｃＲｎタンパク質α鎖の突然変異体は機能性アルブミン結合部位を欠失している。上述したように、ＦｃＲｎは免疫グロブリンとアルブミンのための独立した２箇所の結合部位を有する。アルブミンは、血清中のタンパク質量の３分の２を構成する６７ｋＤの分子である。アルブミンは、脂肪酸や胆汁酸、エイコサノイド、ビタミン、ホルモン、イオン、毒素、薬物等、非常に多種類の分子を輸送する。また、アルブミンは血液のコロイド浸透圧の大部分に預かり、血清の主なｐＨ緩衝タンパク質である。通常の条件では、トータルＩｇＧレベルは１０～１５ｍｇ／ｍＬ（Ｍａｎｚら、２００５）であり、アルブミンレベルは４０～４８ｍｇ／ｍＬ（ＢｅｅｒｓとＢｅｒｋｏｗ、１９９９）である。血漿の全コロイド浸透圧の約７５％がアルブミン画分によりもたらされ、２５％がグロブリン（大部分はＩｇＧ）によるものである（Ｇｕｙｔｏｎ、１９９１）。ＩｇＧとアルブミンの分子量比の簡単な計算によれば（コロイド浸透圧を用いて計算）、ＩｇＧの分子量はアルブミンのほぼ3倍（１５０～１６０ｋＤａに対して６

47

７ｋＤａ）であるので、血漿膠質浸透圧（血清中のタンパク質画分に起因する圧力）に関して、ＩｇＧ３単位による上昇がアルブミン１単位による上昇に相当する。従って、より多くの抗原特異的ＩｇＧを産生させるのにＦｃＲｎの過剰発現は有効となり得るが、あまりよくない状態、特にアルブミンレベルが正常レベルより高くなることを伴う状態に至る場合もある。ＦｃＲｎが異なる２箇所でＩｇＧとアルブミンに結合すること（Ａｎｄｅｒｓｅｎら、２００６；Ｃｈａｕｄｈｕｒｙら、２００６）、そして最近の研究により、ＦｃＲｎα鎖のアルブミン結合部位を突然変異により欠失させたことが、インビトロでのＩｇＧ結合性を失うには至らなかったことが示されたことから（Ａｎｄｅｒｓｅｎら、２００６）、これら２種のリガンド間には競争がないと結論付けることができる。

【０１２５】

競争作用を失わせた場合であっても、本発明に係るＴｇ動物に存在するＦｃＲｎのコピー数によっては、動物に問題を引き起こし得るほど高いレベルにまで血清アルブミンレベルが上昇することがある。従って、アルブミン結合部位が非機能性とされたＦｃＲｎ突然変異を有する動物であれば、本発明に従って有用な抗体をより良好に産生するよう機能することができる。アルブミン結合部位の機能を失わせる特定の突然変異の種類は、当業者であれば容易に決めることができると共に、必要な分子生物学的ステップ及びその他のステップを行うことによって、過度の実験的負荷を伴うことなしに本発明に係るＴｇ動物を作製することができよう。

【０１２６】

本明細書において既に触れたように、本発明に係る動物の健康状態全般は、本発明を経済的に実行可能な方法で実施する上で非常に重要である。本明細書に示すＴｇ動物は、病的症状を呈することなく一年以上生存した。

【０１２７】

本発明の他の実施形態においては、本発明に係る方法は、ＦｃＲｎ活性を有するタンパク質であって、Ｔｇ動物のＦｃＲｎタンパク質の内因性細胞内ドメインと外来性細胞外ドメインとが組み合わされたキメラα鎖を含むタンパク質を有するＴｇ動物を用いる。細胞外ドメイン成分は上述のように選択される。この実施形態においてキメラα鎖は、トランスジーンによってコードされるタンパク質が、その細胞内シグナル伝達性がレシピエント動物のものと一致しないことに起因し正しく機能しないという状態を克服する助けとなることができる。これによりＦｃＲｎヘテロダイマーが機能を失うこともあるが、外来受容体の優れた免疫グロブリン結合能はこのようなキメラ体の利用を有意義なものとしている。当業者であれば、本実施形態のキメラ受容体を作製するために、現在の技術水準である遺伝子工学的手法を容易に適用することができよう。

48

【０１２８】

本発明の他の好ましい実施形態においては、本発明のＴｇ動物は、ヒト又はヒト化された免疫グロブリンを産生させるために既にトランスジェニックされた動物から作製される。本技術分野は、Ｔｇ動物にヒト又はヒト化免疫グロブリンを産生させる重要性を認識しており、最近、様々な種でこのような動物が作られている。インビボにおけるヒトの治療のための低免疫原性ｍＡｂの産生を目的とした一技術は、ヒト抗体遺伝子配列レパートリーを発現するＴｇマウスを使用している。将来的には、この技術をげっ歯類の範疇を越え拡張させてＴｇ家畜（ウシやウサギ等）に、ヒト配列からのポリクローナル血清（Ｌｏｎｂｅｒｇ、２００５）を直接産生させることが可能となろう。ＵＳ２００６１１７３９５は、その内因性抗体の不活化及び発現抑制をもたらし外因性抗体（好ましくはヒト抗体）を発現させる遺伝子改変を含むＴｇウシの作製について記載している。これは、ウシＩｇＭ重鎖の発現抑制（任意的にウシＩｇ軽鎖の発現抑制）と、更に非ウシ抗体（好ましくはヒト抗体）を発現させる人工染色体の導入とにより行われる。ＵＳ２００７００３３６６１は、非ヒトトランスジェニック動物における免疫グロブリンの発現を向上させる他のアプローチを開示しており、これはＢ細胞特異的プロモーターによって特に該動物のＢ細胞中において発現が駆動されるアポトーシス阻害剤を過剰発現させることによりＢ細胞の生存率を向上させるアプローチである。ＷＯ０２１２４３７は、種々のヒト化免疫グロブリンを産生させるために、遺伝子再構成と遺伝子変換が可能な一以上のヒト化免疫グロブリン遺伝子座をＴｇ非ヒト動物中に含むように遺伝子操作されたＴｇ非ヒト動物から産生されるヒト化抗体を開示している。最近になって、ヒト化抗体レパートリーを発現するＴｇウサギが報告された（Ｔｈｏｒｅｙら、２００６）。

【０１２９】

本発明は、免疫グロブリン産生向上という著しい利益をこれらＴｇ動物に提供する。例えば、本発明において概説された手続に従いＦｃＲｎトランスジーンの選択及び導入を行うことにより、レシピエント動物によって産生される免疫グロブリン（内因性免疫グロブリン又はトランスジェニック技術により産生されたヒト若しくはヒト化抗体）にとって最も有効なＦｃＲｎ結合パートナーを用いることができ、これらＴｇ動物における免疫グロブリン産生の最適化を確実に行うことができる。従って本発明は、出発点で既にヒト又はヒト化免疫グロブリンを産生するＴｇ動物を用いて、ＦｃＲｎα鎖の一以上のコピーを導入し且つ本発明の利点を提供することを意図している。或いは、ヒト化免疫グロブリン産生Ｔｇ動物と、本発明に従って作製された動物とを交配させることにより、本発明によって提供される有利な表現型を有する二重トランスジェニック動物を作製することができる。

49

【０１３０】
本発明は他のアスペクトにおいて、動物の血清中における向上したレベルの免疫グロブリンを産生させる方法であって、上述のＴｇ動物を提供することと、免疫グロブリン産生のための確立された任意の免疫感作プロトコールに従って該動物を使用することとを含むことを特徴とする方法を提供する。
【０１３１】
本発明の更なるアスペクトにおいては、免疫応答の向上は、抗原特異的クローン性Ｂ細胞の増殖促進を含む。Ｂ細胞のクローンの増殖と免疫グロブリン合成を介した免疫応答の調節におけるＦｃＲｎの役割については、本明細書において初めて報告される。これは驚くべき予想外の知見である。機能性ＦｃＲｎを欠損させた動物における体液性免疫状態について記述した研究の大部分と、β２ｍノックアウトマウスに関する初期の研究又はＦｃＲｎα鎖ノックアウト動物に関するより最近の研究においては、ＩｇＧ合成障害が示されず、ＩｇＧの低血清レベルはこれら動物におけるＩｇＧ保護障害によるものとされた（ＪｕｎｇｈａｎｓとＡｎｄｅｒｓｏｎ、１９９６；Ｒｏｏｐｅｎｉａｎら、２００３）。しかしながら他の研究により、β２ｍを欠損した動物においてＩｇＧ合成が低下したと報告されたものの、その明確な説明をするには至っていなかった（Ｇｈｅｔｉｅら、１９９６；Ｉｓｒａｅｌら、１９９５）。
【０１３２】
本明細書に示されるように、ｗｔ動物に比べＴｇマウスでは、ＯＶＡ免疫感作後２５日でＯＶＡ特異的ＩｇＭ分泌細胞数が２倍になると共にＯＶＡ特異的ＩｇＧ分泌細胞数が３倍になった。抗原特異的なＢ細胞クローンの増殖促進は、細胞数とは別に観察されたように、Ｔｇマウスの脾臓がｗｔマウスのそれと比較し著しく大きいという知見によって一部説明することができる。より増強された免疫反応は、その細胞性免疫学的プロファイルにより更に支持されるものであり、このプロファイルによれば、Ｔｇ、ｗｔマウスにおける免疫感作後の細胞成分の割合に同様の変化が観察されたが、Ｔｇマウスの示した変化は極めて急激なものであった。両グループにおいて、中程度ではあるが意義深いＣＤ１１ｂ＋／ＣＤ１１ｃ＋／ＭＨＣＩＩの上昇に伴いＢ２２０、ＣＤ３発現細胞が減少し、$CD11b^{high}$／$Gr-1^{high}$を有する細胞の流入の程度が非常に大きくなったことから、二次免疫応答で脾臓に流入した主たる細胞集団は好中球と、そしてこれより程度は小さいが、マクロファージ及び／又は樹状細胞であったことが示唆される。従って本発明の他のアスペクトにおいては、免疫応答の向上は、好中球、マクロファージ及び／又は樹状細胞の二次リンパ器官への流入を刺激することを含む。
【０１３３】
抹消リンパ器官又は二次リンパ器官は、適応免疫応答が

50

開始されリンパ球が維持される部位である。これはリンパ節、脾臓及び粘膜リンパ系器官である。従って好ましい実施形態においては、二次リンパ器官は脾臓及びリンパ節である。
【０１３４】
ＦｃＲｎの発現は単球、マクロファージ及び樹状細胞において観察されるものの（Ｓａｃｈｓら、２００６；Ｓｔｉｒｌｉｎｇら、２００５；Ｚｈｕら、２００１）、これら細胞におけるその機能については依然としてはっきりしておらず、免疫グロブリンの合成に直接的な影響を及ぼすＦｃＲｎの抗原提示における役割についても依然明確ではない。一方、より最近の研究により、ＦｃＲｎが多形核白血球と単球におけるＩｇＧ仲介食作用において主要な役割を果たすことが明らかになった（Ｖｉｄａｒｓｓｏｎら、２００６）。
ＴｇマウスのＢ膜由来の好中球とマクロファージにｂＦｃＲｎの発現が検出されたことから、これらの細胞においてＦｃＲｎを過剰発現させることにより、（免疫複合体としての）抗原の食作用向上、更には抗原提示の向上もが仲介され、これにより抗原特異的なＩｇＭとＩｇＧを産生するより多くの形質細胞を二次リンパ器官中に得ることができる、という仮説を立てることができる。仮にこの理論が正しければ、この向上はＩｇＧが産生された時点で明らかとなるが、それ以前の段階では明らかとはならない。実際にＩｇＭ価の上昇は、主に二次免疫応答において、ＯＶＡ特異的ＩｇＧの生成後にはじめて見られる。しかしながら、脾臓の細胞性免疫学的プロファイルの解析から、免疫感作後の脾臓に流入した主たる細胞種は好中球であることが示された。他の最近の報告によれば（Ｍａｌｅｔｔｏら、２００６）、特異的免疫応答が生じＩｇＧ－抗原免疫複合体が形成された時点でのリンパ器官において、抗原を有する主な細胞集団を好中球が構成しているとのことである。また、二次リンパ器官の好中球は主にＴＮＦαを発現しており、確立される二次免疫応答の質に寄与していることが示された。この知見は、本発明者らのｗｔ、ＴｇマウスにおいてＣＤ１１ｂ$^{high}$とＧｒ－$1^{high}$を有する細胞の著しい流入が見られたことに対する妥当な説明を与える。ＴｇマウスがＯＶＡ特異的ＩｇＧを遥かに多く産生しこれらの細胞においてＦｃＲｎが過剰発現していたことを考慮すると、Ｔｇマウスにおいてより多くのこれら細胞が脾臓に流入したこと、抗原特異的なＢ細胞クローンの増殖がより促進されたこと、その結果として、野生型コントロールに比べより安定的な抗体応答が得られることも説明することができる。
【０１３５】
本発明の重要なアスペクトにおいては、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を、同一種の非トランスジェニック対照動物と比べてより少ない抗原接種回数でこれと同一レベルの体液性免疫応答が発

51

現される非治療的方法において用いることができる。本発明の特徴は、一度に大量の抗血清が必要な場合や（時に高価な抗原を用いて）大多数の動物に並行して免疫感作を行う場合に非常に有利である。追加免疫注射を一回省略することができただけでも、コスト削減には重要である。

【０１３６】

本発明の他の重要なアスペクトにおいては、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を、同一種の非トランスジェニック対照動物と比べてより早くこれと同一レベルの体液性免疫応答が発現される非治療的方法に用いることができる。当業者であれば、本発明に係る動物を用いる場合に適切な免疫感作プロトコールに従うこと、そして産生された抗体の適切な回収時期を決めることは容易であろう。ヤギやヒツジその他大きな動物等の抗体産生用動物を繰り返し用いる場合には、本発明のこの特徴は抗血清の回収サイクル時間を改善させるに至り、その商業的意味は明白である。プロトコールの最後でウサギ等の動物を殺す場合には、商業的利益が更に大きくなる。即ち、顧客から供給される抗原に対するカスタムメイドの抗血清を提供することに特化している抗体製造業者は、依頼された抗血清をより早く提供することができるので、科学的発展が加速し競争が激化している今日において顧客が望まれるポジションに位置することが可能となる。

【０１３７】

本発明は他のアスペクトにおいて、アルブミンの製造を可能とする確立された任意のプロトコールに従って、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含むＴｇ動物を使用することを含むアルブミン製造方法を提供する。上述したように、ＦｃＲｎは免疫グロブリンとアルブミンのための独立した２箇所の結合部位を有する。この場合、２種のリガンド間で競争はないものの、当業者であれば、アルブミンの産生向上を望む場合には本発明に係るＴｇ動物が有用であることは容易に認識されよう。しかしながら、アルブミンレベルが高すぎると動物の健康状態に悪影響を及ぼすことがある。従って、本発明に係る動物をアルブミン産生のために用いる場合には、特に、動物中における機能性ＦｃＲｎ遺伝子のコピー数について注意が必要である。

【０１３８】

関連の実施形態においては、Ｔｇ動物によって保持される遺伝子構築物は、突然変異されたＦｃＲｎタンパク質α鎖であって、免疫グロブリン結合部位が除去されたα鎖をコードする遺伝子を過剰発現させる。従って、非機能性免疫グロブリン結合部位を含む突然変異されたＦｃＲｎを有するＴｇ動物は、本発明に従ってより良好に機能しより多くのアルブミンを産生することができる。免疫グロブリン結合部位の機能を失わせる特定の突然変異の種類は、当業者であれば容易に決めることができると

52

共に、必要な分子生物学的ステップ及びその他のステップを行うことによって、過度の実験的負荷を伴うことなしに本発明に係るＴｇ動物を作製することができよう。

【０１３９】

本発明は更なるアスペクトにおいて、本発明に係るＴｇ動物又は本発明に係る方法によって得られるＴｇ動物から得られる動物繁殖材料であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を含む動物繁殖材料を提供する。本明細書において「動物繁殖材料」という用語は、実質的に自身と同一の遺伝子組成を有する他の動物を当業者が作製することを可能とする動物に由来する任意の生物材料を意味する。動物繁殖材料は好ましくは、精子、精原細胞、卵子、卵巣組織、胚及び体細胞クローニング用組織サンプルから成る群から選択される。

【０１４０】

本発明は他のアスペクトにおいて、免疫応答の変化に関する条件について試験するのに有用なモデル動物の体液性免疫応答を向上させる方法であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記動物に導入するステップを含むことを特徴とする方法を提供する。好ましい実施形態においては、提供されるＴｇ動物は自己免疫疾患用モデル動物に適している。本明細書での記載に基づけば、向上したＦｃＲｎ活性を有する動物は向上した全体的な血清免疫グロブリンレベルを有しており、自己免疫状態に至る病態をより高レベルで及び／又は長期に亘って保持していることは明らかである。この種の動物は、自己免疫状態を治療するための化合物の試験又はそれに関連する他の目的のために有用である。

【０１４１】

当業者であれば、本発明がその利点により、本発明の精神を維持しつつ更なる応用に適用されるべき対象となることが理解されよう。従って本発明は、目的とする抗原に対する体液性免疫応答を向上させる必要のある患者の遺伝子治療に使用する遺伝子構築物であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を提供する。

【０１４２】

関連の実施形態において本発明は、免疫応答を向上させる必要のある患者を治療する方法であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記患者に導入することを含むことを特徴とする方法を提供する。

【０１４３】

ＦｃＲｎ活性の向上について、血清中の免疫グロブリンの維持に非常に有利であることが本明細書全体を通して示されている。ネイティブな免疫グロブリン産生レベルが正常状態よりも実質的に低く重篤な疾患に至るＩｇＧサブクラス欠損症、分類不能型免疫不全症（ＣＶＩＤ）、Ｘ連鎖無ガンマグロブリン血症、など数種の疾患及び不全がある。治療計画は通常、天然の欠損症においてそれらのレベルを増大させるために、大量の治療用免疫グロブリンを様々な量で投与することを含む。本発明の精

53

神においては、本発明の遺伝子構築物を用いる遺伝子治療により、外因性免疫グロブリンの投与の必要性を小さくすることができ、また治療頻度の減少につながり且つネイティブに産生された免疫グロブリンの保持期間が長くなる。

【０１４４】

当業者であれば、本発明がその利点により、本発明の精神を維持しつつ更なる応用に適用されるべき対象となることが理解されよう。従って本発明は、天然の免疫グロブリン産生により内因的に生成されるか又は治療手段により外因的に生成される血清免疫グロブリンレベルを上昇させる必要のある患者の遺伝子治療に使用する遺伝子構築物であって、前記遺伝子構築物は向上したＦｃＲｎ活性を提供し、前記ＦｃＲｎは、前記患者によって産生されるか又は前記患者に投与される免疫グロブリンに特異的な親和性を有することを特徴とする遺伝子構築物を提供する。

【０１４５】

関連の実施形態においては、本発明は、血清免疫グロブリンレベルを上昇させる必要のある患者を治療する方法であって、向上したＦｃＲｎ活性を提供する遺伝子構築物を前記患者に導入することを含み、前記ＦｃＲｎは、前記患者により産生されるか又は前記患者に投与される免疫グロブリンに特異的な親和性を有することを特徴とする方法を提供する。

【０１４６】

好ましい実施形態においては、本発明に係る遺伝子構築物又は方法はヒトである患者に対して用いられる。

【０１４７】

他の実施形態においては、本発明に係る遺伝子構築物又は方法は、ＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする遺伝子を過剰発現させる。更に好ましい実施形態においては、ＦｃＲｎのα鎖をコードする遺伝子は、該遺伝子の一個より大の機能的コピーを前記患者のゲノムに組み込むことにより過剰発現される。

【０１４８】

他の実施形態においては、本発明に係る遺伝子構築物又は方法は、ＦｃＲｎタンパク質のα鎖をコードする遺伝子を内皮細胞にのみ過剰発現させる。遺伝子組み換えのための適切なベクターを作製するために当業者が用いることができるヒト（Ｃｏｗａｎら、１９９８）又は他の動物種（Ｈａｏら、２００６）の内皮特異的プロモーターが数種存在する。

【０１４９】

非ヒトＴｇ動物に関して上で行った検討事項はいずれも、ヒトに対する本発明の遺伝子治療アプローチを適宜変更する際にも適用可能である。

【実施例】

【０１５０】

実施例１－ｂＦｃＲｎα鎖遺伝子（ｂＦＣＧＲＴ）を有するＢＡＣクローンの単離及び特性評価

ｂＦＣＧＲＴを有するＢＡＣクローンの単離

雄性成体（２才）ボスタウラスジャージーのリンパ球由来ＤＮＡを用いて作製されたウシＢＡＣライブラリーから９０αＢＡＣを単離した（ドイツヒトゲノムプロジェクトのリソースセンター／プライマリーデータベース（ＲＺＤＰ）、マックスプランク分子遺伝学研究所、ベルリン、ドイツから取得；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｚｄｐ．ｄｅ／）。ｂＦｃＲｎα鎖ｍＲＮＡ（２０６～４２５ｂｐ；ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＦ１３９１０６）特異的プライマーを用いたＰＣＲスクリーニングによりｂＦＣＧＲＴ陽性ＢＡＣクローンを同定すると共にこれをＰＣＲ増幅した（ＢＦｃＩＳ：５’－ＣＡＧＴＡＣＣＡＣＴＴＣＡＣＣＧＣＣＧＴＧＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１）；ＢＦｃＩａｓ：５’－ＣＴＴＧＧＡＧＣＧＣＴＴＣＧＡＧＧＡＡＧＡＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２）］。次のステップとして、ｂＦＣＧＲＴのＤＮＡ配列を、この遺伝子のエキソン部分にアニールするプライマーを用いて決定した（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２０００）。ｂＦＣＧＲＴ上流のフランキング領域を分析するために、ＢＡＣのＤＮＡをＢａｍＨＩで消化し、消化後のＤＮＡをアガロースゲル上で分離した。α１ドメイン由来のＤＮＡ断片をプローブとして用いてサザンブロットを行うことにより９ｋｂ長の陽性バンドを検出した。次いで、この９ｋｂ長のＢａｍＨＩ断片をｐＧＥＭ－１１ｚｆ（＋）ベクターにサブクローン化した。更にサブクローニングプロセスを行うことにより、エキソン１～エキソン３と２ｋｂのプロモーターセグメントとを同一ベクター内に得た。続いて、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　ＢｉｇＤｙｅＴｅｒｍｉｎａｔｏｒ　Ｃｙｃｌｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　Ｒｅａｄｙ　Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（ＡＢＩ、３７３Ａ－Ｓｔｒｅｔｃｈ、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）（Ｃｙｂｅｒｇｅｎｅ　Ｃｏｍｐａｎｙ）（フディンゲ、スウェーデン）を用いてインサートの配列を完全に決定した。

【０１５１】

ｂＦＣＧＲＴ特異的プライマー：ＦｃＲｎＦ：５’－ＣＧＧＣＣＡＣＣＴＣＴＡＴＣＡＣＡＴＴＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３）及びＦｃＲｎＲ：５’－ＴＧＣＡＴＴＧＡＣＣＡＣＡＣＴＴＧＧＴＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４）（ＧｅｎＢａｎｋ　ＮＷ９２９３８５）を用いて、ウシＢＡＣライブラリー（Ｅｇｇｅｎら、２００１）から１８９ＨＯ２ＢＡＣと１２８Ｅ０４ＢＡＣを単離した。単離したＢＡＣクローンのインサートサイズは、これらクローンをＮｏｔＩ制限エンドヌクレアーゼで消化することにより分析した。Ｅｘｐａｎｄ　Ｌｏｎｇ　Ｔｅｍｐｌａｔｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｒｏｃｈｅ）を用いて、インサート中のｂＦＣＧＲＴの５’、３’ボーダー領域のサイズを決定した。２セットのプライマーを設計し、ｐＢＡＣ－アッパープライマー（５

54

55

’－ＡＣＣＴＣＴＴＴＣＴＣＣＧＣＡＣＣＣＧＡＣＡＴＡＧ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５、Ｕ８０９２９　１１３８０－１１４０４）とｂＦｃＲｎ－アンチセンスプライマー（ＧＴＴＣＡＡＧＴＣＣＡＡＡＧＧＣＡＧＧＣＴＡＴＣＴ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．６）を用いて５’オーバーハング領域を増幅し、他方、ｂＦｃＲｎ－センス（ＣＣＴＴＴＡＣＣＣＡＣＡＣＣＣＡＣＴＣＣＣＣＡＣＡ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．７）とｐＢＡＣ－ローワー（ＡＧＡＡＧＴＴＣＧＴＧＣＣＧＣＣＧＣＣＧＴＡＧＴＡ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ：８、Ｕ８０９２９、３８０１－３７７７）（アンチセンスプライマー）を用いてｂＦＣＧＲＴの３’オーバーハング領域を増幅した。

【０１５２】

ｂＦＣＧＲＴの特性評価

ｂＦＣＧＲＴの転写開始点の上流領域約１８００ｂｐとｂＦＣＧＲＴ遺伝子全体の配列を決定し、ＮＣＢＩに寄託されたウシゲノム配列とＢＬＡＳＴプログラムを用いて比較した。配列を決定した断片について、ＲｅｐｅａｔＭａｓｋｅｒプログラム（Ｓｍｉｔら、１９９６～２００４）（ｈｔｔｐ：ｒｅｐｅａｔｍａｓｋｅｒ．ｏｒｇ）を用い散在反復配列と低複雑度ＤＮＡ配列に基づいてスクリーニングした。ＲｅｐｅａｔＭａｓｋｅｒによってスクリーニングされる散在反復配列データベースは、反復データベースに基づいている（Ｒｅｐｂａｓｅ　Ｕｐｄａｔｅ；（Ｊｕｒｋａら、２００５））。得られたデータはＮＣＢＩに寄託されたウシ配列とよく一致しており、第１イントロンに属する２００２～２２８７ｂｐ間に２８５ｂｐ長のギャップを有するものの、最初の３４７７ｂｐ（未配列決定２．５ｋｂ領域まで）はクローンＮＷ９２９３８５（ボスタウラス染色体１８ゲノムコンティグ）と９９％の同一性を示す。分析された配列の第２の部分は、同一のゲノムコンティグと９９％の同一性を示す１７８０ｂｐ（未配列決定２．５ｋｂセグメント以後）を含んでいた。この断片もまた、イントロン６に属する１６７ｂｐ長のギャップ（１２０３～１３７０ｂｐ）を有している。２個の未同定セグメントは反復配列（単純反復）を含んでおり、このことは相同性がないことを説明している。これらのアラインメントに基づいて欠失部分のサイズを計算したところ２５５６ｂｐであった。従ってこの配列は、６４８６１１～６５６４２６ｂｐの間でウシゲノムコンティグＮＷ９２９３８５と高い相同性を示すことが分かった。

【０１５３】

また、入手可能なｂＦｃＲｎα鎖ｃＤＮＡ配列を（ＥＳＴデータベース（ＮＣＢＩ）から取得した配列及び参照配列と共に）ｂＦＣＧＲＴゲノム配列にアラインメントすることにより転写開始部位を分析した。ウシ、ヒト、ラット、マウスの各ＦＣＧＲＴのゲノム構成について、ＮＣＢＩ　Ｍａｐ　Ｖｉｅｗｅｒを用いて比較した（データは示さず）。

56

【０１５４】

ｂＦＣＧＲＴ陽性ＢＡＣクローンの特性評価

ウシ新生児型Ｆｃ受容体α鎖遺伝子（ｂＦＣＧＲＴ）とそのゲノム環境を含む、３種のＢＡＣクローン９０α、１８９ＨＯ２及び１２８Ｅ０４を単離した。ＮｏｔＩによる消化後、ＢＡＣベクター由来のゲノムインサートをパルスフィールドゲル電気泳動で分析したところ、クローン１８９ＨＯ２、クローン１２８Ｅ０４及びクローン９０αがそれぞれ、約１３０ｋｂサイズのウシゲノムインサート、約１００ｋｂサイズのウシゲノムインサート、約９０ｋｂサイズのウシゲノムインサートを含むことが示された。

【０１５５】

次いで、ｂＦＣＧＲＴ遺伝子のボーダー領域のサイズを長距離ＰＣＲで決定した。得られたデータから、９０αＢＡＣと１８９ＨＯ２ＢＡＣが、それぞれ８．５ｋｂと１４ｋｂの５’、３’フランキング領域を含んでおり（これはそのサイズに対応している）、組込み部位に依存しないｂＦＣＧＲＴ遺伝子の組織特異的発現を確実に行わせる調節エレメントの全てを有しているとは限らないという可能性が示された。２個のプライマーセットを用いたクローン１２８ＨＯ２のＰＣＲ増幅からは産物は何ら得られなかった。Ｅｘｐａｎｄ　Ｌｏｎｇ　Ｔｅｍｐｌａｔｅ　ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍは安定的な増幅方法であり、ファージＤＮＡから最長２５ｋｂのアンプリコンを生成することから、本発明者らは、このクローンのｂＦＣＧＲＴの５’、３’双方のボーダー領域は２５ｋｂよりも長いという結論に至り、１２８Ｅ０４ＢＡＣをマイクロインジェクション用に選択した。

【０１５６】

ウシゲノムリソース（ウェブサイト：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｐｒｏｊｅｃｔｓ／ｇｅｎｏｍｅ／ｇｕｉｄｅ／ｃｏｗ／）の最近のデータと１２８Ｅ０４ＢＡＣの５’、３’末端配列を用いて、本発明者らは、ｂＦＣＧＲＴボーダー領域の正確なサイズとゲノムコンテキストを決定することができた：５’調節領域は４４ｋｂまで伸長しており、３’は５０ｋｂ長である。データから、１２８Ｅ０４ＢＡＣは５種の推定タンパク質コード遺伝子（ＦＬＴ３ＬＧ、ＬＯＣ５３９１９６、ＬＯＣ５２２０７３、ＬＯＣ５１１２３４、ＬＯＣ５１１２３５）とｂＦＣＧＲＴを含んでいることが示された（図１Ａ）。

【０１５７】

実施例２－ウシＢＡＣ１２８Ｅ０４を有するトランスジェニックマウスの作製と遺伝子タイピング

マイクロインジェクション用ＢＡＣクローン１２８Ｅ０４からの１０２ｋｂゲノムインンサートの調製及びウシＢＡＣ１２８Ｅ０４を有するトランスジェニックマウスの作製

Ｓｃｈｅｄｌら（Ｓｃｈｅｄｌら、１９９６）によって

57

公開されたプロトコールを一部変更してマイクロインジェクション用ＢＡＣ（クローン１２８Ｅ０４）ＤＮＡの調製を行った。精製したＢＡＣ（極低コピープラスミド用Ｑｉａｇｅｎ ｐｌａｓｍｉｄ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎにて）をＮｏｔＩ（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ）で消化して目的のインサートを遊離し、プレパラティブパルスフィールド１％アガロースゲルで単離した。このインサートを含むゲルスライスをＬＭＰ（低融点）ゲルと混合し、Ｇｅｌａｓｅ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）で消化した。Ｍｉｃｒｏｃｏｎ ＹＭ５０（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）カラムを用いて、アガロースからインサートを分離した。このインサートを、マイクロインジェクションに適切なバッファー（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、ｐＨ８．０、１００ｍＭ ＮａＣｌ（０，０３ｍＭスペルミン／０，０７ｍＭスペルミジン（ＳＩＧＭＡ）含有又は不含））中に溶出させた。ＤＮＡの濃度は、マイクロインジェクションバッファー（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．５、０．１ｍＭ ＥＤＴＡ、１００ｍＭ ＮａＣｌ）を用いて０．４ｎｇ／μＬに調整し、受精したＦＶＢ／Ｎマウス卵母細胞に注入した。レシピエントは１０週齢のＣＤ１雌性とした。実験動物は、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒｓ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｈｕｎｇａｒｙ Ｌｔｄ.（ブダペスト）から得た。

【０１５８】

トランスジェニックマウスの特性評価

マウス中にｂＦＣＧＲＴが存在するかどうかを検出するために、胚移植により生誕した同腹子と、ファウンダーのＧ１、Ｇ２子孫の尾部バイオプシーによりゲノムＤＮＡを単離し、ＰＣＲ増幅を２回行うことによりスクリーニングした。２種のプライマーペアは、９０αＢＡＣクローンのｂＦＣＧＲＴ配列に基づき設計した。第１のプライマーペアは、センスとしてのｂＦｃＳｕｆ：５’－ＣＴＣＣＴＴＴＧＴＣＴＴＧＧＧＣＡＣＴＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．９）と、アンチセンスとしてのＢＦｃＬ５’－ＧＣＣＧＣＧＧＡＴＣＣＣＴＴＣＣＣＴＣＴＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１０）から成り、これらは６００ｂｐの産物（１２７５～１８９４ｂｐ）を与え、一方、第２のプライマーペアは、センスとしてのＦｃｒｎｆｐｒ／ｉｎ５’－ＡＡＡＧＴＴＴＣＴＣＧＡＧＡＧＡＧＧＣＡＧＡＧＡＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１１）と、アンチセンスとしてのＦｃｒｎｒｐｒ／ｉｎ５’－ＴＡＧＴＴＡＣＡＧＡＧＣＣＴＧＧＡＴＡＧＧＣＴＧＡ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１２）であり、これらは４１０ｂｐの産物（１６９８～２１０８ｂｐ）を与えた。形質転換実験の結果は表１に示す。

【０１５９】

【表１】

58

ウシＢＡＣ１２８Ｅ０４を有するトランスジェニックマウスの作製

| | 注入された構築物 | １２８Ｅ０４ |
|---|---|---|
| 胚数 | マイクロインジェクション | ５５０ |
| | 移植 | ３６０ |
| 動物数 | 生誕 | ４１ |
| | トランスジェニック | ６ |
| マイクロインジェクション効率 | 生誕動物数／Ｔｇ数 | １４．６ |

【０１６０】

表１に示すように、合計４１匹のパブ（ｐｕｂ）が生誕し、ｂＦＣＧＲＴの有無について尾部ＤＮＡを遺伝子タイピングした。６匹のファウンダーから３種の独立したＴｇ系統を確立した。これら系統の内の２系統である＃１４と＃１９は、第１世代においてトランスジーンの遺伝はメンデルの法則に従うパターンを示した（それぞれ合計３０匹又は３４匹の同腹子のうち、１７匹又は１２匹がトランスジーンを有していた）。一方、第３の系統である＃９はファウンダー動物においてある程度のモザイク現象を示した。Ｔｇマウスは、その同腹子と重量及び健康状態全般において区別がつかなかった。

【０１６１】

長距離トランスジーン完全性の解析

ウシゲノムマップ（ＧｅｎＢａｎｋ Ｍａｐ Ｖｉｅｗｅｒ Ｂｕｉｌｄ ３．１（Ｂｔａｕ３．１に基づく）ウシ染色体１８；５３５４３８５２～５３６５２０２４ｂｐ間の領域）に基づいて、導入したＢＡＣに局在する５種の推定タンパク質コード遺伝子用とＢＡＣ１２８Ｅ０４の５’、３’末端用に設計した特異的プライマーペアを用い、３種のＴｇ系統におけるトランスジーンの完全性について評価した。プライマー配列及び条件は表２に示す。

【０１６２】

【表２】

59

組み込まれたＢＡＣ１２８Ｅ０４のインタクトネスを評価するためのプライマーとＰＣＲ条件

| 推定遺伝子 | プライマー | Ｔｍ（℃） | 産物（ｂｐ） |
|---|---|---|---|
| ＢＡＣ１２８ＥＯＨ５’末端 | ５’－ＴＴＴＡＧＣＴＧＣＡＴＣＧＧＧＡＴＣＴＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１３）<br>５’－ＧＧＡＧＴＧＡＴＧＧＣＡＴＴＴＧＧＴＴＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１４） | ６１ | ４４１ |
| ＦＬＴ３ＬＧ | ５’－ＴＣＧＧＡＧＡＴＧＧＡＧＡＡＡＣＴＧＣＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１５）<br>５’－ＣＴＧＧＡＣＧＡＡＧＣＧＡＡＧＡＣＡＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１６） | ６１ | ５４７ |
| ＬＯＣ５３９１９６ | ５’－ＡＧＡＡＣＧＴＧＣＧＴＡＣＣＡＡＡＡＧＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１７）<br>５’－ＡＧＣＧＧＴＴＧＴＡＣＴＴＴＣＧＧＡＴＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１８） | ６１ | ７８７ |
| ｂＦＣＧＲＴ | ５’－ＣＣＡＡＧＴＴＴＧＣＣＣＴＧＡＡＣＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１９）<br>５’－ＧＴＧＴＧＧＧＣＡＧＧＡＧＴＡＧＡＧＧＡ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２０） | ６１ | １６１ |
| ＬＯＣ５２２０７３ | ５’－ＡＧＴＧＧＴＣＣＴＧＧＧＡＴＴＧＡＣＡＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２１）<br>５’－ＴＣＡＣＴＧＡＧＴＣＣＣＧＴＡＴＧＴＧＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２２） | ６１ | ２６６ |
| ＬＯＣ５１１２３４ | ５’－ＣＴＡＣＧＴＧＴＧＣＧＣＣＧＴＧＡＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２３）<br>５’－ＡＡＴＣＡＧＣＴＴＣＴＣＣＡＣＧＣＡＣＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２４） | ６１ | ２２０ |
| ＬＯＣ５１１２３５ | ５’－ＧＴＴＧＴＴＣＡＣＡＣＣＡＧＧＧＡＡＣＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２５）<br>５’－ＣＣＴＴＴＧＣＣＡＴＴＧＴＡＧＡＴＧＴＡＧＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２６） | ６１ | ２９５ |
| ＢＡＣ１２８ＥＯＨ３’末端 | ５’－ＡＧＴＣＧＴＧＴＣＣＧＡＣＴＣＴＴＴＧＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２７）<br>５’－ＣＡＧＣＣＴＧＴＣＴＧＧＴＧＴＴＣＴＧＡ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２８） | ６１ | ４１６ |

【０１６３】

ＢＡＣ１２８ＥＯＨの５’末端配列とＢＡＣ１２８ＥＯＨの３’末端配列をＡ．Ｅｇｇｅｎ（Ｉｎｒａ、Ｊｏｕｙ－ｅｎ－Ｊｏｓａｓ、フランス）より得た。プライマーペアはいずれも、１２８Ｅ０４ＢＡＣ及びウシゲノムＤＮＡと同一のＰＣＲ産物を与え、系統＃９ＤＮＡ以外ではインタクトなＢＡＣの組み込みが示された。系統＃９では、ＬＯＣ５１１２３４、ＬＯＣ５２２２３５及びＢＡＣ１２８Ｅ０４の３’末端特異的ＰＣＲにおいてＰＣＲ産物が得られなかった（図１Ｂ）。従ってこのＴｇ系統では、組み込まれたＢＡＣトランスジーンの３’末端から推定３０ｋｂ長の断片が欠失したと結論付けることができる。大きなトランスジーンにおいて、５’、３’両末端からゲノム断片が欠失することはよく見られる現象である（Ｒａｇｕｚら、１９９８）。しかしながら、場合によってはＢＡＣＤＮＡの欠失部分に存在していた可能性もある特性評価されていない調節エレメントが存在しないことにより、ｂＦＣＧＲＴの発現が影響を受けるという可能性を排除するために、系統＃９に対する更なる研究は行わなかった。

【０１６４】

トランスジーンの染色体位置

両トランスジェニック系統のマウス染色体の同一セグメントにウシＢＡＣ１２８Ｅ０４クローンが偶発的に組み込まれてトランスジェニックマウス系統＃１４と＃１９の表現型がトランスジーンの組み込み部位における（一以上の）未同定遺伝子の挿入突然変異の影響を受けるという可能性を排除するために、蛍光インシチュハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）により１２８Ｅ０４トランスジーンのゲノムへの組み込みを可視化させた。１２８Ｅ０４ＢＡＣＤＮＡを、ニックトランスレーションによりビオチン－１４－ｄＡＴＰ（ＢｉｏＮｉｃｋ標識化キット、インビトロジェン、ＵＳＡ）で標識した。次いで、低張処理とメタノール：酢酸（３：１）固定とを含む標準的なプロトコールに従い、分裂期染色体をビンブラスチン処理済み線維芽細胞から得た。この線維芽細胞は、１３．５日齢のホモ接合体である＃１４胚と＃１９胚のそれぞれから単離したものである。

【０１６５】

先の記載（Ｈａｙｅｓら、１９９２）に従って効率的にＦＩＳＨを行った。ビオチン化プローブを変性し、変性染色体スプレッドに３７℃で一晩ハイブリダイズさせた。ヤギに産生させた抗ビオチン抗体（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｉｎｃ、バーリンゲーム、ＣＡ）で染色体のハイブリダイゼーション部位を増幅し、フルオレセイン結合ウサギ抗ヤギＩｇＧ（Ｎｏｒｄｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ティルブルフ、オランダ）と共に更にインキュベーションすることにより可視化した。ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ；Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、バーリンゲーム、ＣＡ）で染色体調製物を対比染色し、Ｎｉｋｏｎ Ｅｃｌｉｐｓｅ Ｅ６００落射蛍光顕微鏡（ニコンインスツルメンツ；川崎、日本）で観察した。蛍光イメージはＣｏｈｕ ４９１０ ＣＣＤカメラ（Ｃｏｈｕ、Ｉｎｃ．；サンディエゴ、ＣＡ、ＵＳＡ）で撮像し、アップルマッキントッシュＧ４コンピューターに接続されたＭａｃＰｒｏｂｅ ４．３ ＦＩＳＨ ソフトウェア（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｉｍａｇｉｎｇ；ニューカッスルアポンタイン、ＵＫ）を用いてデジタル化した。

【０１６６】

ＦＩＳＨ解析の結果から、蛍光標識ＢＡＣ１２８Ｅ０４がマウス系統＃１４及び＃１９それぞれの全く異なる染色体セグメントにハイブリダイズしていることが示された。これは、表現型が組み込み部位依存的であるという可能性を排除するものである。染色体中に見られる１個のスポットは、複数のコピー（系統＃１４では２、系統＃１９では５）の組み込みトランスジーンがタンデムリピートを形成している可能性が非常に高いことを示す（図２）。

【０１６７】

実施例３－ウシＦＣＧＲＴ（ｂＦＣＧＲＴ）遺伝子のコピー数のＦｃＲｎ発現量に対する影響

リアルタイム定量的ポリメラーゼ連鎖反応によるトランスジーンのコピー数の決定

リアルタイムＰＣＲは、Ｔｇ動物におけるトランスジーンのコピー数と接合性を決定する定量的且つ精確な方法である（Ｔｅｓｓｏｎら、２００２）。１２８Ｅ０４ＢＡＣトランスジーンのコピー数は、次のようにして、ｂ

60

61

ＦＣＧＲＴと内部標準マウスβ－アクチン遺伝子の絶対定量法により決定した。

【０１６８】

１２８Ｅ０４ＢＡＣトランスジーンのコピー数は、ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ ７０００ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を用いてＴａｑＭａｎ法により決定した。プライマーとプローブのオリゴヌクレオチド配列は、デフォルトパラメーターを用いてＰｒｉｍｅｒ Ｅｘｐｒｅｓｓ ｖ２．０プログラム（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）により設計した（プライマーとプローブは表３に示す）。従来のフェノール／クロロホルム法を用いると共にクロロホルム抽出ステップを行うことにより、ヘミ接合性動物の尾部サンプルからＤＮＡを抽出した。

【０１６９】

【表３】

ｂＦＣＧＲＴトランスジーンのコピー数決定のためのプライマーとプローブ

| | | |
|---|---|---|
| マウスβ－アクチン | プローブ | ＶＩＣ－ＴＧＧＣＴＴＴＣＴＧＡＡＣＴＴＧＡＣＡＡＣＡＴＴＡＴ－ＴＡＭＲＡ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２９） |
| | フォワード | ＴＴＣＡＣＣＴＧＣＣＣＴＧＡＧＴＧＴＴＴＣ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３０） |
| | リバース | ＴＧＡＡＧＧＴＣＴＣＡＡＡＣＡＴＧＡＴＣＴＧＴＡＧＡ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３１） |
| ウシＦＣＧＲＴ | プローブ | ＦＡＭ－ＣＡＣＡＧＴＣＡＡＧＡＧＴＧＧＣＧＡＣＧＡＧＣＡＣ－ＴＡＭＲＡ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３２） |
| | フォワード | ＧＣＡＣＣＡＣＧＣＡＧＣＧＧＴＡＧＴ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３３） |
| | リバース | ＣＣＴＴＣＴＡＣＧＣＣＴＧＧＴＣＡＴＣＡＣ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３４） |

【０１７０】

各サンプルにおけるマウスβ－アクチン遺伝子とｂＦＣＧＲＴ遺伝子を、検量線を用いた絶対定量法により定量した。最大３２倍希釈の５点を使用した標準曲線は、各プライマーセットで高い線形性を示した。ＰＣＲによる定量の線形性と効率について定量前に評価した。各サンプルは２連にして行った（図３）。

【０１７１】

各細胞中２コピーの内因性β－アクチン遺伝子を、ＤＮＡ濃度を決定する内部標準として用いた。マウスゲノムＤＮＡを用いて、β－アクチン遺伝子の検量線を作成した。ｂＦＣＧＲＴ遺伝子の絶対定量は、マウスゲノムＤＮＡを添加した１２８Ｅ０４ＢＡＣの段階希釈物を用いて作製した標準曲線に基づき行った。ｂＦＣＧＲＴ遺伝子のコピー数は、標準曲線を用い次の計算に基づいて決定した。即ち、ＤＮＡ量を正確に測定しこれからサンプル中の２倍体ゲノム数を決定し、ｂＦＣＧＲＴ遺伝子の検量線から系統＃１４と＃１９由来のヘミ接合性動物のＤＮＡサンプル中のコピー数を決定した。これらの計算を行った後、Ｔｇマウス系統＃１４及び＃１９のヘミ接合性動物それぞれにおけるｂＦＣＧＲＴ遺伝子のコピー数を２及び５であると決定した（表４）。

【０１７２】

62

【表４】

細胞数の絶対量とサンプルのＦｃＲｎコピー数の絶対量はそれぞれ、マウスβ－アクチン検量線とＦｃＲｎ検量線を用いることにより得た（図３）。ヘミ接合性動物におけるｂＦｃＲｎトランスジーンの推定コピー数は、系統＃１４で２、系統＃１９では５であった。

| 系統＃ | 遺伝子 | Ｃｔ | サンプル中遺伝子絶対量（ＡＧＮ） | サンプル中細胞数絶対量（ＡＣＮ） | ｂＦｃＲｎコピー数（ＡＣＮｂ－ＦｃＲｎ／ＡＣＮ） | ２倍体ヘミ接合性動物中のｂＦｃＲｎトランスジーン推定コピー数 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | マウスβ－アクチン | 31.01 | 3780.49 | 1880.248 | | |
| | bFcRn | 28.88 | 3852.48 | | 2.04 | 2 |
| 19 | マウスβ－アクチン | 30.89 | 4075.44 | 2037.722 | | |
| | bFcRn | 27.05 | 10488.18 | | 5.13 | 5 |

【０１７３】

逆転写酵素ＰＣＲとノザン分析による、転写レベルでのコピー数決定

ＲＮＡｚｏｌ（登録商標）Ｂ（ＴＥＬ－ＴＥＳＴ ＩＮＣ）を用いて、６週齢雌性の肝臓、肺及び乳腺と新生児の腸からトータルＲＮＡを抽出した。モロニーマウス白血病ウィルス（Ｍ－ＭＬＶ）の逆転写酵素と、製造業者（Ａｃｃｅｓ ＲＴ－ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ；Ｐｒｏｍｅｇａ）により推奨されている（ｄＴ）１７－アダプタープライマーとを用いて２μｇのＲＮＡを逆転写した。プライマーペア：Ｂ７ ５’－ＧＧＣＧＡＣＧＡＧＣＡＣＣＡＣＴＡＣ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３５）及びＢ８ ５’－ＧＡＴＴＣＣＣＧＧＡＧＧＴＣＷＣＡＣＡ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３６）（ここで、Ｗは Ａ又はＴのいずれかになり得る）を用いてＰＣＲを行うことにより、３６７ｂｐ長のｂＦＣＧＲＴ特異的アンプリコン（９１４～１２８０ｂｐ、（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２０００））を得た。増幅セグメントは１％アガロースゲル電気泳動により分離しエチジウムブロミドで染色した。

【０１７４】

反芻動物のＦｃＲｎ転写産物は多数の上皮細胞に検出されると共に（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ｂ；Ｍａｙｅｒら、２００４；Ｍａｙｅｒら、２００２）血管内皮細胞においても検出された（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ａ）ことから、ｂＦｃＲｎα鎖の発現は、泌乳Ｔｇ雌性成体の肺、肝臓及び乳腺と、新生児の腸についてＲＴ－ＰＣＲを用い解析した。ウシＦｃＲｎα鎖のｍＲＮＡは、系統＃９、＃１４、＃１９由来ヘミ接合性動物の、選択したいずれの組織においても発現していた（図４Ａ）。

【０１７５】

トランスジーン発現量のコピー数依存性について評価すると共に内因性ウシＦｃＲｎα鎖のｍＲＮＡ量とこの発現量を比較するために、系統＃１４及び＃１９のそれぞれとウシに由来する肝臓ＲＮＡサンプルを、ノザンブロットを用いて分析した。トータルＲＮＡを若年成体雌性マウスの肝臓から単離し、５μｇのトータルＲＮＡを１％アガロース／２．２Ｍホルムアルデヒドゲルでサイズ分画し、Ｈｙｂｏｎｄ Ｎ＋メンブラン（Ａｍｅｒｓｈａｍ）に移した。次いで、上述のＢ７及びＢ８プライマーを用いてＰＣＲにより合成した３２Ｐ標識ｃＤＮＡプ

63

ローブをハイブリダイズさせた。１８ＳＲＮＡシグナルを内部標準として用いて、ゲル中のＲＮＡローディング量を評価した。得られたシグナルは、ＰｈｏｓｐｈｏｒＩｍａｇｅｒ（登録商標）を用いて評価すると共にＳＴＯＲＭ（登録商標）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｙｎａｍｉｃｓ）で定量した。コピー数が２、４、５及び１０のＴｇマウス間におけるｂＦｃＲｎｍＲＮＡ特異的シグナル密度の比較をスチューデントのＴ検定により行った。

【０１７６】

結果から、系統＃１９におけるトランスジーンｍＲＮＡ発現レベルがより高いことが分かる。ＢＡＣトランスジーンを２コピー有する系統＃１４ヘミ接合性Ｔｇマウスの肝臓でのｍＲＮＡ発現レベルは、ウシの肝臓におけるレベルの９０％に達していた（図４Ｂ）。

【０１７７】

両Ｔｇ系統に由来する２又は３匹のヘミ及びホモ接合体動物のシグナル強度の統計的評価と定量分析とから、Ｔｇマウスの肝臓におけるウシＦｃＲｎα鎖のｍＲＮＡ量はそのトランスジーンのコピー数と厳密に相関しており、その差はｐ＜０．０５確率水準で有意であることが示された（図４Ｃ）。トランスジーンのコピー数が２であるＴｇマウスの肝臓でのＦｃＲｎα鎖ｍＲＮＡ発現レベルがウシの肝臓でのｍＲＮＡレベルと同等であるという事実と共にこの結果は、１２８Ｅ０４ＢＡＣは、コピー数依存的ではあるが位置依存的ではないｂＦＣＧＲＴ発現を保証するのに必要な調節エレメントを全て有することを示している。

【０１７８】

トランスジェニックマウスの肺におけるｂＦｃＲｎα鎖タンパク質の検出

ウシＦｃＲｎα鎖のタンパク質レベルでの発現をウェスタン分析により検討した。タンパク質抽出物をポリアクリルアミド変性トリスグリシンゲルで分離し、アフィニティー精製済みウサギ抗血清を用いてブロットをプローブした（この抗血清は、高度に保存された１７３～１８６のｂＦｃＲｎα鎖アミノ酸残基に、ＫＬＨとコンジュゲートさせるためのＮ末端Ｃｙｓを加えたペプチドＣＬＥＷＫＥＰＰＳＭＲＬＫＡＲに対して産生されたものである（Ｍａｙｅｒら、２００２））。結合したｂＦｃＲｎα鎖抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ウサギ抗体と、基質としてルミノール系溶液とを用いた向上した化学発光により検出した。ｂＦｃＲｎα鎖が安定にトランスフェクトされたウシ乳房上皮細胞株（Ｂ４）をポジティブコントロールとして用いた（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ａ）。

【０１７９】

両Ｔｇ系統由来のヘミ接合性肺サンプル中に４０ｋＤのタンパク質（これは、ｂＦｃＲｎα鎖の知られた分子量（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２０００）と一致している）が検出されたが、ネガティブコントロールとして用いた野生型には見られなかった（図５）。トランスジェニックＦｃＲｎα鎖の分子量は、ｂＦｃＲｎが安定的にトランスフェクトされたＢ４ウシ乳房上皮細胞株（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ａ）により産生される組み換えタンパク質と適合していた。更にこのデータから、５コピーのｂＦｃＲｎトランスジーンを発現している＃１９マウス由来のサンプルは、２コピーのトランスジーンを発現している系統＃１４マウスで検出されたｂＦｃＲｎタンパク質よりも遥かに多いｂＦｃＲｎタンパク質を産生することをノザンブロット分析の結果が示していることが確認された（図５）。

64

【０１８０】

これらのデータから１０２ｋｂ長のＢＡＣクローンは、ｂＦｃＲｎα鎖を生理的レベルで再現可能且つ組織特異的に発現するのに必要な遺伝的調節エレメントの全てを有していることが示され（図４Ａ）、このことは、マウスにおけるウシトランスジーンの挙動が、時期を問わず、ウシ組織中の当該遺伝子の発現パターンと同等であるとみなすことができることを強調している。

【０１８１】

実施例４－ウシＢＡＣトランスジェニックマウスにおけるマウスＩｇＧ及びヒトＩｇＧの半減期を分析するインビボ研究

ＴｇマウスにおけるｂＦｃＲｎα鎖の発現を分析すると共にウシＦｃＲｎα鎖とマウスβ２ｍが機能的受容体を形成し得るかどうかを試験するために、マウスＩｇＧとヒトＩｇＧのクリアランスについて分析した。後者については既に調べられており、最近になってウシＦｃＲｎがウシＩｇＧに対するよりもヒトＩｇＧに対して遥かによく結合すること（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ａ）が示された。

【０１８２】

プレブリード後、年齢、体重及び性別（雄性）が一致するホモ接合体＃１４と対照マウス（各群３～５匹）の静脈内に、抗ＯＶＡマウスＩｇＧ１（ｍＡｂ、Ｓｉｇｍａ）を１０ｍｇ／ｋｇ体重（ＢＷｋｇ）、ヒトＩｇＧ（Ｏｃｔａｐｈａｒｍａ（ストックホルム、スウェーデン）より譲り受けた静注用Ｇａｍｍｏｎａｔｉｖ）を１０ｍｇ／ＢＷｋｇ又は２０ｍｇ／ＢＷｋｇでそれぞれ５０ｍｇ／ｍＬ生理溶液を用いてマイクロインジェクションし、続く２１６時間で定期的に血液サンプル（５０μＬ／回）を後眼窩静脈叢（ｒｅｔｒｏｏｒｂｉｔａｌ ｐｌｅｘｕｓ）から採取した。捕捉試薬としてＯＶＡ（Ｓｉｇｍａ）を用い且つ検出試薬としてＨＲＰコンジュゲートアフィニティー精製済みポリクローナルヤギ抗マウスＩｇＧ（γ鎖特異的）（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｉｎｃ．、バーミンガム、ＡＬ、ＵＳＡ）用いる定量的ＥＬＩＳＡにより、実験過程における抗ＯＶＡマウスＩｇＧ１血漿濃度を評価した。先に記載の定量的ＥＬＩＳＡアッセイ（Ｋａｃｓｋ

65

ｏｖｉｃｓら、２００６ａ）によりヒトＩｇＧ血清濃度を決定した。捕捉試薬として卵白アルブミン（Ｓｉｇｍａ）を用い且つ検出試薬としてＨＲＰコンジュゲートアフィニティー精製済みポリクローナルヤギ抗マウスＩｇＧ（γ鎖特異的）（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｉｎｃ．、バーミンガム、ＡＬ、ＵＳＡ）を用いる定量的ＥＬＩＳＡにより、実験過程における抗卵白アルブミンマウスＩｇＧ１血漿濃度を評価した。ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン；Ｓｉｇｍａ）を基質として用いることによりペルオキシダーゼコンジュゲート抗体を検出した。サンプルは２連でアッセイした。Ｉｇ濃度は参照標準に基づいて得られる。

【０１８３】

最初の１０日間におけるマウスの平均ＩｇＧ濃度の分析は、ＷｉｎＮｏｎＬｉｎプロフェッショナルバージョン４．１（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ、Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ、ＣＡ）を用いたツーコンパートメントモデルにデータを適合させることにより行った。

【０１８４】

マウスＩｇＧのクリアランス曲線は二相性であり、相１（アルファ相）は血管内と血管外の各コンパートメント間の平衡を表し、相２（ベータ相）は緩やかな排出を表す。２１６時間までの相１及び２の数学的モデル化により、ＦｃＲｎ仲介ＩｇＧ薬物動態の一般的なスキーム（Ｌｏｂｏら、２００４）との良好な相関関係が示された。従って本発明者らは、このタイムフレームにおけるｍＩｇＧのアルファ及びベータ相の半減期を算出した。

推定されるアルファ相の半減期は、ｗｔ及びＴｇマウスにおいていずれも約５時間であった。これに対して、ツーコンパートメントモデル化解析に基づけば、ｗｔ動物で１２５．４±３．２時間（平均±ＳＥＭ）、Ｔｇ動物で１６５．１±７．８時間であり、ベータ相の半減期には有意差があった（ｐ＜０．０５）（表５；図６Ａ）。

【０１８５】

ｈＩｇＧの場合もｍＩｇＧのクリアランスデータと同様に、本研究により得られたデータの２１６時間までの相１及び２の数学的モデル化によって、ＦｃＲｎ仲介ＩｇＧ薬物動態の一般的なスキームとの良好な相関関係が示された。従って本発明者らは、このタイムフレームにおけるｈＩｇＧのアルファ及びベータ相の半減期を算出した。ツーコンパートメントモデル化解析に基づくと、アルファ相は野生型マウスとトランスジェニックマウスの双方において約１０時間であり、グラム当たり１０マイクログラムとした実験とグラム当たり２０マイクログラムとした実験との間で差がなかった。ベータ相の場合には、ｗｔマウスとＴｇマウス間に有意差が見られた（ｐ＜０．０５）。算出されたベータ相は、ｗｔ及びＴｇマウスのそれぞれにおいて、グラム当たり１０マイクログラムを注射した場合には１０６±３．６時間と１７１．

66

５±１６．２時間であり、グラム当たり２０マイクログラムを注射した場合には１０８．２±３．７時間と１８１±７．７時間であった（表５；図６Ｂ）。予想されたように曲線下面積（ＡＵＣ）値は顕著に異なり、グラム当たり２０マイクログラムを注射した実験では、グラム当たり１０マイクログラムとした実験に比べ約２倍の値を示した。一方、グラム当たり１０μｇ又は２０μｇのｈＩｇＧを注射した場合においては、アルファ半減期とベータ半減期のいずれについても顕著な相違は見られなかった。

【０１８６】

本発明者らは、これらの実験（グラム当たり１０マイクログラムのＩｇＧを注射した実験）においてｍＩｇＧのクリアランスデータとｈＩｇＧのそれとを比較することにより、ｈＩｇＧはｗｔマウスから有意に（ｐ＜０．０５）早く排出されたことを見出した（ヒトＩｇＧ／マウスＩｇＧが１０６時間／１２５．５時間）。しかしながらＴｇ動物においては、マウスＩｇＧとヒトＩｇＧの各クリアランスデータに差はなかった（表５）。

【０１８７】

【表５】

野生型マウス及びｂＦｃＲｎトランスジェニックマウスにおけるマウスＩｇＧとヒトＩｇＧの薬物動態パラメーター（各値は平均±ＳＥＭを表し、ＭＲＴは平均滞留時間、ＡＵＣは曲線下面積である）

| | 用量 μｇ／ＢＷｇ | アルファ相 半減期 （時間） | ベータ相 半減期 （時間） | ＭＲＴ 時間 | ＡＵＣ 時間*μｇ／ｍＬ | n |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ＷＴ－ｍＩｇＧ | １０ | ５．２ ±０．６ | １２５．４ ±３．２ | １６７．７ ±５．６ | １２４４４．５ ±１４４７ | ５ |
| ＴＧ－ｍＩｇＧ | １０ | ４．６ ±０．２ | １６５．１ ±７．８ | ２２７．２ ±１１．９ | １４７１３．３ ±７５８．８ | ５ |
| ＷＴ－ｈＩｇＧ | １０ | ８．２ ±１．８ | １０６ ±３．５７ | １３９．８ ±４．８ | ７３５１．２ ±３７６．５ | ４ |
| ＴＧ－ｈＩｇＧ | １０ | １２．７ ±１．８ | １７１．５ ±１６．２ | ２２７．９ ±２１．３ | １５４５６ ±１２１４．９ | ５ |
| ＷＴ－ｈＩｇＧ | ２０ | １０．８ ±５．７ | １０８．２ ±３．７ | １５１．８ ±５．８ | １７５７４．３ ±１７１１ | ３ |
| ＴＧ－ｈＩｇＧ | ２０ | １３．２ ±７．５ | １８１ ±７．７ | ２６５．１ ±５．９ | ３０７８８．５ ±３０１８．４ | ４ |

【０１８８】

結論として、ＢＡＣトランスジェニックマウスにおけるこれらのＩｇＧクリアランス研究によって、β２ｍの主立った欠損はなくウシＦｃＲｎα鎖が機能的複合体をマウスβ２ｍと形成していることが確認された。ＴｇマウスではｍＩｇＧ１のクリアランスは著しく低減され、このことは、投与された抗体の保護に利用可能なマウスＦｃＲｎとハイブリッドＦｃＲｎの量が、インビボにおけるクリアランスからの保護の程度に寄与していることを示している。更に、Ｔｇ動物においてはマウスＩｇＧとヒトＩｇＧとのクリアランスデータに差がなく、これはハイブリッドｂＦｃＲｎα鎖ｍβ２ｍ受容体がｈＩｇＧ１も保護することができることを示している。

【０１８９】

実施例５－卵白アルブミンによる免疫感作

67

ホモ接合体＃１４とヘミ接合体＃１９（それぞれ４又は５コピーのｂＦＣＧＲＴをコード）及び年齢、性別（雄性）が一致したｗｔマウス（各群５匹）の腹腔内に、２５０μｇの卵白アルブミン（ＯＶＡ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）と完全フロイントアジュバント（ＣＦＡ）を用いて免疫感作し、１４日後に２５０μｇのＯＶＡと不完全フロイントアジュバント（ＩＦＡ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）を接種した。

【０１９０】

実験手続はいずれも、アグリカルチュラルバイオテクノロジーセンター（ゲデレー、ハンガリー）の動物ケア・倫理委員会（Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｅｔｈｉｃｓ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ）による認可を受けたものである。

【０１９１】

抗原特異的ＩｇＭ及びＩｇＧの力価

ｂＦｃＲｎ過剰発現によるＩｇＧの保護以外の免疫学的重要性を明らかにするために、ｗｔとＴｇ（＃１４及び＃１９）マウスを免疫感作し２週間後にＯＶＡを接種して、その血清中の抗ＯＶＡＩｇＭと抗ＯＶＡＩｇＧそれぞれの力価を測定した。５６日間、後眼窩静脈叢から血液サンプル（５０μＬ／回）を採取した。ＯＶＡ、ＦＩＴＣ特異的ＩｇＭ、ＩｇＧについて血清をアッセイした。捕捉試薬としてＯＶＡ、ＦＩＴＣ－アルブミン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）を用いると共に検出試薬としてＨＲＰコンジュゲートアフィニティー精製済みポリクローナルヤギ抗マウスＩｇＭ及びヤギ抗マウスＩｇＧ（μ鎖、γ鎖特異的）（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｉｎｃ．、バーミンガム、ＡＬ、ＵＳＡ）を用いる定量的ＥＬＩＳＡにより、実験過程における抗－ＯＶＡ、抗－ＦＩＴＣマウスＩｇＭ、ＩｇＧの血漿濃度を評価した。基質としてＴＭＢ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）を用いることによりペルオキシダーゼコンジュゲート抗体を検出した。各血清試験サンプルの段階希釈物を測定に用いた。Ｉｇ濃度は、用量反応曲線の直線部分から内挿される４５０ｎｍでの吸光度に基づいて示される。サンプルは２連でアッセイした。スチューデントの両側ｔ検定を用いて、処理群の平均値の統計的有意性を評価した。ｐ≦０．０５であれば、各値は有意に異なると考えられる。

【０１９２】

結果から、一次免疫応答時にはｗｔ動物とＴｇ動物間に差がないが、追加免疫感作後はＯＶＡ－特異的ＩｇＭ、ＩｇＧの力価が著しく異なることが示された。二次抗体応答時のＩｇＭ価は、一次免疫応答時と比べてＩｇＭピークが僅かに低い、ｗｔ動物に典型的な曲線を示した。一方、Ｔｇマウスの場合、ＩｇＭ価は一次免疫応答時よりも二次免疫応答時に高く、ｗｔマウスと比較し有意に

68

高かった（図７Ａ）。ＩｇＧ価に関しては、二次免疫応答においては、ＴｇマウスのＯＶＡ－特異的ＩｇＧ価はｗｔマウスのそれの約３倍であった（図７Ｂ）。

【０１９３】

ＩｇＧサブクラスプロファイル

次に、ＯＶＡ－特異的血清免疫グロブリンのＩｇＧサブクラスプロファイルを決定した。免疫感作後３２日目に、ｗｔマウスとＴｇマウス（＃１４）由来の血清をＯＶＡ特異的ＩｇＧアイソタイプについてアッセイした。捕捉試薬としてＯＶＡを用いると共に検出試薬としてＨＲＰ－コンジュゲートアフィニティー精製済みポリクローナルヤギ抗－マウスＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ及びＩｇＧ３（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ Ｉｎｃ．、バーミンガム、ＡＬ、ＵＳＡ）を用いる定量的ＥＬＩＳＡにより、抗－ＯＶＡＩｇＧアイソタイプの血漿濃度を評価した。基質としてＴＭＢを用いることによりペルオキシダーゼ－コンジュゲート抗体を検出した。各血清試験サンプルの段階希釈物を測定に用いた。Ｉｇ濃度は、用量反応曲線の直線部分から内挿される４５０ｎｍでの吸光度に基づいて示される。サンプルは２連でアッセイした。

【０１９４】

ＯＶＡ－ＣＦＡとＯＶＡ－ＩＦＡで順次免疫感作した動物は、抗－ＯＶＡ抗体ＩｇＧ１サブクラスを主に産生することが見出された。データから、Ｔｇマウスにより産生されたＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ及びＩｇＧ２ｂのＯＶＡ－特異的力価は有意に高いことが示された。ＩｇＧ３産生量については、Ｔｇマウスはｗｔマウスよりも僅かに高かったものの、結果の標準偏差が大きくその差は有意ではなかった。またこのデータから、ＯＶＡ特異的ＩｇＧアイソタイプの間の比がｗｔマウスのそれと同様であることが示された（図７Ｃ）。

このことは、量が異なるほかは、ＴｇマウスでのｂＦｃＲｎ発現はＯＶＡ－特異的免疫応答に対して変化をもたらさなかったことを示す。

【０１９５】

トータルＩｇＧレベル

捕捉試薬として未標識アフィニティー精製済みヤギ抗－マウスポリクローナル抗体（ヤギ抗－マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）；Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ、Ｉｎｃ．、バーミンガム、ＡＬ、ＵＳＡ）を用いると共に検出試薬としてホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートアフィニティー精製済みポリクローナルヤギ抗－マウスＩｇＧ（γ鎖特異的；Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ、Ｉｎｃ．、バーミンガム、ＡＬ、ＵＳＡ）を用いる定量的ＥＬＩＳＡにより、実験過程におけるマウスＩｇＧの血漿濃度を評価した。基質としてＴＭＢ（Ｓｉｇｍａ）を用いることによりペルオキシダーゼコンジュゲート抗体を検出した。サンプル

69

は２連でアッセイした。

【０１９６】

トータルＩｇＧレベルの分析から、免疫感作前でもＴｇマウス（＃１４）ＩｇＧ産生量がｗｔマウスに比べて有意に高いことが示された（ｗｔマウス、Ｔｇマウスのそれぞれにおいて２．４±０．４mg／mL、４．８±０．５mg／mL（平均±ＳＥＭ、ｐ＜０．０１））。免疫感作後、トータルＩｇＧレベルは常時上昇し、そのレベルはｗｔ動物、Ｔｇ動物それぞれにおいて２８日目、３６日目でピークに達した。特筆すべきことに、本発明者らは、ＩｇＧの最大レベルが両動物間で顕著且つ有意に異なることを見出した。即ち、ｗｔ、Ｔｇマウスにおいてそれぞれ１４．８±２．６mg／mL（平均±ＳＥＭ）、３９．９±２．７mg／mL（ｐ＜０．００１）であった（図７Ｄ）。

【０１９７】

ファゴサイトーシスアッセイ

Ｔｇマウスにおいて産生されるＯＶＡ特異的ＩｇＧの機能的インタクトネスを評価するために、ＯＶＡ免疫感作後３５日で回収したＴｇ、ｗｔマウス血清とＯＶＡ－ＦＩＴＣとを血清の量を変えてインキュベートすることによりＯＶＡ－抗ＯＶＡ抗体複合体を調製し、マウスマクロファージ細胞株Ｐ３８８Ｄ１を用いてファゴサイトーシスアッセイを行った。ＦＩＴＣによるＯＶＡのラベリングは、製造業者の取扱説明書（ＭｏｌｅｃｕｌａｒＰｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）に従った手続きにより行った。Ｐ３８８Ｄ１細胞株のマウスマクロファージは、５%ウシ胎児血清（Ｓｉｇｍａ－　Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）と１０μＭ　２－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）とを添加したＲＰＭＩ１６４０培地（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）中、３７℃で増殖させた。２４ウェル細胞培養プレート中、$2\times10^5$ 細胞／ウェルを１５ｎｇホルボールミリステートアセテート（ＰＭＡ、３０ｎｇ／mL、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）にて３７℃で６０分間処理した。ＯＶＡ－抗ＯＶＡ抗体複合体を調製するために、ＯＶＡで免疫感作したＴｇ、ｗｔマウス（免疫感作後３５日）由来の血清２．５μL、１０μL、４０μLとＯＶＡ－ＦＩＴＣ（１μｇ／μL）５０μｇとを３７℃で６０分間プレインキュベートした。ＯＶＡ－抗ＯＶＡ抗体複合体をＰＭＡ処理Ｐ３８８Ｄ１細胞と３７℃で９０分間インキュベートすることによりファゴサイトーシスさせた。よく洗浄して未結合タンパク質を除去した後、フローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）により細胞を分析した。細胞外ＦＩＴＣ－標識ＯＶＡの消光にはトリパンブルーを用いた。

【０１９８】

免疫複合体の取込み効率についてＦＡＣＳで分析した。Ｔｇ、ｗｔマウスいずれの場合においてもその血清を２．５μL用いた場合には、非オプソニン化ＯＶＡ－ＦＩＴＣの取込みに比べ向上したファゴサイトーシスは見られなかった。しかしながら、血清を１０μL用いた場合には、Ｔｇマウスの血清では有意な向上が見られたが、ｗｔマウスの血清では見られなかった。最後に、Ｔｇ、ｗｔマウスそれぞれの血清を４０μL用いた場合にはいずれにおいても、非オプソニン化抗原の取込みに比べてファゴサイトーシスが上昇した（図７Ｅ）。これらのデータから、Ｔｇマウス血清が免疫感作３５日目でＯＶＡ特異的抗体含有量が非常に高いことと、それが機能的にインタクトであることが示された。

70

【０１９９】

実施例６－Ｔｇ、ｗｔマウスは、ＦＩＴＣ－デキストランによる免疫感作に対し同様に応答する

主にＩｇMを産生する免疫応答を分析するために、Ｔｇ、ｗｔマウスの腹腔内にＦＩＴＣ－デキストランを免疫感作し、２週間後に再度同様にして接種した。ＦＩＴＣ－デキストランは、典型的なＴ細胞非依存性ＩＩ型抗原（デキストラン）（Ｍｏｎｄら、１９９５）とハプテン（ＦＩＴＣ）とのコンジュゲートであり、血清中には主にＦＩＴＣ特異的ＩｇMが見られ、ＦＩＴＣ特異的ＩｇＧは殆ど見られなかった。ＦＩＴＣ特異的免疫応答に関しＴｇ、ｗｔ動物間で差はなかった。免疫感作過程における免疫応答を分析したところ、Ｔｇ、ｗｔマウスのいずれにおいても二次免疫感作後にＩｇM産生の上昇が見られた（図８）。

【０２００】

実施例７－ＯＶＡ特異的ＩｇM、ＩｇＧ産生細胞に対するｂＦｃＲｎ過剰発現の影響

ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによるＯＶＡ特異的Ｂ細胞の分析

ＴｇマウスにおけるＯＶＡ特異的ＩｇMの力価上昇から、ｂＦｃＲｎ過剰発現は、より多くのＩｇＧを保護することに寄与するだけではなくＢ細胞クローンの増殖という点で免疫応答に変化をもたらすことが示唆された。この観察結果を検証するために、先ず、ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを用いてＯＶＡ特異的Ｂ細胞を分析することにより、免疫感作後２５日での脾臓中における抗－ＯＶＡＩｇM、抗－ＯＶＡＩｇＧ分泌形質細胞数を分析した。

ホモ接合体＃１４とｗｔマウス（各群３匹）の腹腔内にＯＶＡ２５０μｇとＣＦＡを免疫感作し、１４日後にＯＶＡ２５０μｇとＩＦＡを接種した。初回免疫感作後２５日でこれらの動物を殺しその脾臓細胞をＯＶＡ特異的ＩｇM、ＩｇＧ細胞について分析した。ＥＬＩＳＰＯＴでは、ＭｕｌｔｉＳｃｒｅｅｎ－ＨＴＳプレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ベッドフォード、ＭＡ）を、５μｇ／mLのＯＶＡ含有ＰＢＳ溶液で３時間室温にて被覆した。次いで、このプレートをＰＢＳで６回洗浄し、５%ＦＣＳとメルカプトエタノール（５０μＭ）とを含有するＲＰＭＩ培地で３０分間室温にてブロッキングした。脾

71

臓細胞の段階希釈物（$5\times10^5$ 細胞／ウェルから開始）を各ウェルに添加した。このプレートを5％$CO_2$ 条件下37℃で一晩インキュベートし、ＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで6回洗浄した。続いて、ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗－マウスＩｇＧ（γ重鎖特異的；１：４０００倍希釈物；Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を各ウェルに添加した。室温にて1時間インキュベートした後、プレートをＰＢＳ－Ｔｗｅｅｎで6回洗浄した。次いで、プレートを色原体基質である3－アミノ－9－エチルカルバゾール（ＡＥＣ；Ｓｉｇｍａ）と$H_2O_2$ の存在下に室温にてインキュベートした。反応は水洗することにより停止させた。ウェル当たりのスポット形成ユニット（ＳＦＵ）をＩｍｍｕｎｏＳｃａｎ ＥＬＩｓｐｏｔリーダー（Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｌｔｄ.、ＵＳＡ）でカウントし、ＩｍｍｕｎｏＳｐｏｔソフトウェア ｖｅｒ．３．２（Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｌｔｄ.、ＵＳＡ）で評価した。

【０２０１】

結果から示されるように脾臓において、ＯＶＡ特異的ＩｇＭ産生細胞数は2倍になっており（ｐ＜０．０５）、ＯＶＡ特異的ＩｇＧ産生細胞数は3倍超となっていた（ｐ＜０．００１）（図9Ａ）。

【０２０２】

免疫感作によりもたらされる脾臓への好中球の大量流入ＯＶＡによる免疫感作により、脾臓重量の増加（図９Ｂ）とその細胞数の増加（図９Ｃ）が見られ、また抹消リンパ節の拡大が観察された。この現象はｗｔ、Ｔｇマウスのいずれにも見られたが、脾臓のサイズはＴｇ動物ではｗｔコントロールの2倍になっていた（ｐ＜０．００１）。

【０２０３】

続いて本発明者らは、フローサイトメトリーにより脾臓における細胞種分布の特性化を行った。ＦＡＣＳを行うため脾臓細胞を単離し、先ず、抗－ＣＤ３２／ＣＤ１６（クローン２．４Ｇ２）と３０分間インキュベートした。次いで、染色バッファー（０．１％ＢＳＡと０．１％アジ化ナトリウムとを含有するＰＢＳ）中、この細胞をフルオロクロムコンジュゲート特異的Ａｂと4℃で５０分間インキュベートした後、２回洗浄し、続いてＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェア（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、サンホセ、ＣＡ）を取付けたＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒで分析した。コンジュゲートｍＡｂであるＣＤ４５Ｒ／Ｂ２２０－ＰＥＣｙ５、Ｉ－Ａ／Ｉ－Ｅ－ＰＥ、ＧＲ－１（Ｌｙ－６Ｇ）－ＰＥ及びＣＤ１１ｂ－Ａ６４７は、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ（サンディエゴ、ＣＡ）より得た。ＣＤ３－Ａ６４７、ＣＤ８６－ＰＥ、ＣＤ１１ｃ－Ａ６４７及びＣＤ１１ｂ－ＰＥはそれぞれ、Ｃａｌｔａｇ（バーリンゲーム、ＣＡ）、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（サンディエゴ、ＣＡ）、Ｓｅｒｏｔｅｃ（デュッセルドルフ、ドイツ）及びＩｍｍｕｎｏＴｏｏｌｓ ＧｍｂＨ（Ｆｒｉｅｓｏｙｔｈｅ、ドイツ）から購入した。アイソタイプコントロールはＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ又はＳｅｒｏｔｅｃから得た。

72

【０２０４】

結果から、免疫感作後においてはＣＤ４５Ｒ／Ｂ２２０を有する細胞（Ｂリンパ球）とＩ－Ａ／Ｉ－Ｅ（ＭＨＣクラスＩＩ）抗原の割合が有意に減少した（ｐ＜０．０５）ことが示された。ＣＤ３マーカーを有する細胞（Ｔリンパ球）に関しては、ｗｔ、Ｔｇマウスのいずれの場合も差がないか或いはそれ程急激ではない減少が見られた。これらの現象はｗｔ、Ｔｇマウスにおいて見られたがＴｇ動物でより強調されている（図１０）。

【０２０５】

免疫感作後、ＣＤ１１ｂマーカーとＧｒ－１マーカーを有する細胞の割合は、ｗｔ、Ｔｇマウスのいずれにおいても劇的に上昇した（ｐ＜０．００１）。この上昇レベルに関し本発明者らは、ｗｔマウスで約５倍の上昇、Ｔｇマウスで約９倍の上昇であることを見出した。また、本発明者らはＧｒ－１を発現した細胞の大部分が、前方／側方光散乱（ＦＣＳ／ＳＳＣ）パラメーターから典型的な顆粒球位置である$Gr\text{-}1^{high}$ であること見出し（図１１Ａ）、このことから、これら細胞が好中球であることが示唆された（データは示さず）。改めて、この上昇はＴｇマウスの場合により顕著であるということができる（ｐ＜０．０１）（図１１Ａ）。本発明者らはまた、ＣＤ１１ｂとＭＨＣクラスＩＩ抗原を有する細胞（マクロファージ、樹状細胞）の割合（図１１Ｂ）、ＣＤ１１ｂ抗原とＣＤ１１ｃ抗原を有する細胞（樹状細胞）の割合（図１１Ｃ－ゲートセル）は、Ｔｇマウスにおいてそのｗｔコントロールよりも有意に上昇していることを見出した（それぞれｐ＜０．０５、ｐ＜０．０１）。これらの結果は、ＭＨＣＩＩとＢ２２０を有する細胞の比例的減少について述べるものではあるが、免疫感作後の細胞数が脾臓で増加しているので（図９Ｃ）、総細胞数の減少は意味しない。これらの分析に基づき本発明者らは、免疫感作後２５日で脾臓に流入した細胞の大部分は好中球であると結論付けたが、樹状細胞数の増加も見られた。

【０２０６】

実施例８－腹腔滲出好中球、マクロファージ、樹状細胞においてｂＦｃＲｎ発現量が高い

ｂＦｃＲｎα鎖の発現について、先ず、コンカナバリンＡ（ＣｏｎＡ、１００μｇ／マウス（ＰＢＳ溶液）；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）による腹腔内処理後２日のマウス由来の腹腔滲出細胞を分析した。好中球に富む細胞調製物を得るために、５％（ｗ／ｖ）カゼイン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ブダペスト、ハンガリー）の滅菌生理食塩水溶液２ｍＬでマウスに腹腔内注射し、注射後６時間で腹腔細胞を単離

した。次いで、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ　Ｐｌｕｓ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ウプサラ、スウェーデン）で遠心分離（４００×ｇ、３０分、ＲＴ）することにより好中球を精製した。好中球の精製度は、抗－ＣＤ１１ｂ試薬と抗－Ｇｒ－１試薬を用いるフローサイトメトリーにより測定したところ～８０％であった（図１２）。

【０２０７】

Ｔｒｉｚｏｌ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カールスバッド、ＣＡ）を用いてこれらの細胞からトータルＲＮＡを抽出した。次いで標準的なプロトコールに従い、モロニーマウス白血病ウィルス（Ｍ－ＭＬＶ）の逆転写酵素（Ｐｒｏｍｅｇａ）と（ｄＴ）１７－アダプタープライマーとを用いて２μｇのＲＮＡを逆転写した。プライマーペア：Ｂ３　５’－ＣＧＣＡＧＣＡＲＴＡＹＣＴＧＡＳＣＴＡＣＡＡ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３７、ここでＲはＧ又はＡに、ＹはＴ又はＣに、ＳはＧ又はＣになり得る）とＢ４５’－ＧＧＣＴＣＣＴＴＣＣＡＣＴＣＣＡＧＧＴＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３８）を用いてＰＣＲを行うことにより、４２２ｂｐ長のｂＦｃＲｎα鎖特異的アンプリコン（ＡＦ１３９１０６の２８９～７１１ｂｐ）を得た。増幅セグメントを１％アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロミドで染色した。

【０２０８】

先ず、ＣｏｎＡ処理済みＴｇ、ｗｔマウス由来の腹腔滲出細胞において、ｂＦｃＲｎの発現をＰＣＲ増幅により検出した。ｂＦｃＲｎの発現は好中球とマクロファージに富む細胞集団にも見られ、精製細胞は～７８％がＣＤ１１ｂ$^{ｈｉｇｈ}$／Ｇｒ－１$^{ｈｉｇｈ}$であり、～２０％がＣＤ１１ｂ$^{ｈｉｇｈ}$／Ｇｒ－１$^{－}$であった（図１２）。

【０２０９】

より最近の研究によって、ＦｃＲｎは、多形核白血球と単球のＩｇＧ仲介ファゴサイトーシスにおいて主要な役割を果たすことが示された（Ｖｉｄａｒｓｓｏｎら、２００６）。これは、ＦｃＲｎが抗原提示に関わっていることを示唆している。本発明者らのデータに基づけば、これらの細胞におけるｂＦｃＲｎの過剰発現は、抗原のファゴサイトーシスの向上と共に抗原提示の向上をも仲介し、その結果、二次リンパ器官における抗原特異的ＩｇＭ、ＩｇＧ産生形質細胞の増加に至るという仮説を立てることができる。仮にこの理論が正しいとすれば、この向上はＩｇＧが産生された時点で明らかとなるが、それ以前の段階では明らかとはならない。実際にＩｇＭ価の上昇は、主に二次免疫応答において、ＯＶＡ特異的ＩｇＧの生成後にはじめて見られる。

【０２１０】

実施例９－免疫感作マウス脾臓中におけるＯＶＡを有する樹状細胞、好中球、Ｂリンパ球の存在

本発明者らが行った細胞分析から、免疫感作後、脾臓に



流入した主な細胞種は好中球であることが示された。他の最近なされた報告に基づけば、二次リンパ器官において好中球は抗原を有する主たる細胞集団であり、特異的な免疫応答が生じると直ちにＩｇＧ－抗原免疫複合体が形成され、これが、確立される二次免疫応答の質に寄与しているとのことである（Ｍａｌｅｔｔｏら、２００６）。好中球の流入が実際に抗原特異的免疫応答に依存しているかどうか、そしてこれが抗原を有しているかどうかを実験で確かめるために、ＯＶＡによる免疫感作後５６日で（この時期は依然としてＯＶＡ特異的ＩｇＧレベルは高い－図７Ｂ）更なる免疫感作は行っていないトランスジェニックマウスをＦＩＴＣ－ＯＶＡで腹腔内処理した。この実験においてマウスは（ホモ接合体＃１４）、ＯＶＡ－ＦＩＴＣ（７．４ｍｇ／ｍＬ、１００μＬ／マウス）で腹腔内処理した。ＯＶＡ－ＦＩＴＣ注射から５時間後に、マウスの脾臓を摘出しその細胞をフローサイトメトリーと共焦点顕微鏡法により分析した。フローサイトメトリーを行うために、細胞は次の各試薬を用いて上述のように処理した：即ち、ＣＤ４５Ｒ／Ｂ２２０－ＰＥＣｙ５、ＧＲ－１（Ｌｙ－６Ｇ）－ＰＥ、ＣＤ１１ｃ－Ａ６４７、ＣＤ１１ｂ－Ａ６４７及びＣＤ１１ｂ－ＰＥ。共焦点顕微鏡法を行うに当たり、細胞はＤＲＡＱ５赤色蛍光細胞透過性ＤＮＡプローブ（Ｂｉｏｓｔａｔｕｓ　Ｌｔｄ．、英国）にてＲＴで１０分間染色した。洗浄ステップ後、Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＦＬＵＯＶｉｅｗ５００レーザースキャニング共焦点顕微鏡（ハンブルグ、ドイツ）を高倍率（６３×対物）で用いて、蛍光／ＤＩＣ像（５１２×５１２ピクセル）を記録した。ＦＩＴＣとＤＲＡＱ５の各染料の励起は４８８ｎｍのアルゴンレーザー線と６３２Ｈｅ－Ｎｅレーザー線を用いて行った。

【０２１１】

得られたフローサイトメトリーデータによれば、ＯＶＡにより免疫感作された動物においてＯＶＡ－ＦＩＴＣ陽性細胞（１５．１±１．４％）の内、６１．２±５．４％がＢ２２０陽性（Ｂリンパ球）であり、１８．５±０．６％がＣＤ１１ｂ$^{ｈｉｇｈ}$、Ｇｒ－１$^{ｈｉｇｈ}$（好中球）として検出され、１３．５±２．１％がＣＤ１１ｂ、ＣＤ１１ｃ陽性（樹状）細胞であることが示された。非免疫感作動物（２．１±０．３％）においては、ＯＶＡ－ＦＩＴＣ陽性細胞数は多くは見られなかった（図１３Ａ、１３Ｂ）。ＯＶＡ－ＦＩＴＣ陽性好中球とＢリンパ球に関するフローサイトメトリーにより得られたデータについて共焦点顕微鏡法により確認した。本発明者らは、ＯＶＡ－ＦＩＴＣを取込む多葉の核を有する典型的な好中球を見出した一方で、他の細胞、恐らくはＢリンパ球（大きな球形の核とその周縁に薄く細胞質を有する）がＯＶＡ－ＦＩＴＣによって被覆されていることを見出した（図１３Ｃ）。脾臓サイズと細胞数に関して、免疫感作動物と非免疫感作動物間に有意差は見られなかっ

75

た（データは示さず）。この知見は、本発明者らが得た他の結果と非常によく符合し、免疫感作後２５日のｗｔ、ＴｇマウスにおいてＣＤ１１ｂ、Ｇｒ－１陽性好中球が著しい流入を示す理由を説明するものである。Ｔｇマウスが遥かに多量のＯＶＡ特異的ＩｇＧを産生したこと（図７Ｂ）、そしてこれらの細胞中でＦｃＲｎが過剰発現したこと（図１２）を考慮すると、Ｔｇマウスにおいてこれらの細胞の流入の程度がより大きかったこと、抗原特異的なＢ細胞のクローンの増殖がより盛んであったこと、その結果として安定的な抗体応答が見られたことも説明することができる。

【０２１２】

実施例１０－レンチウィルスによるトランスジェネシスを用いたｂＦｃＲｎトランスジェニックマウスの作製

最近になって、レンチウィルスベクター由来のＨＩＶとＥＩＡＶを用いることにより、再現性のある高トランスジェネシス率がマウス（Ｐｆｅｉｆｅｒら、２００２）、ラット（Ｌｏｉｓら、２００２）、トリ（ＭｃＧｒｅｗら、２００４）、ブタ（Ｈｏｆｍａｎｎら、２００３；Ｗｈｉｔｅｌａｗら、２００４）及びウシ（Ｈｏｆｍａｎｎら、２００４）で達成された。トランスファーベクターｐＷＰＴＳ－ＥＧＦＰ（Ｂｏｖｉａら、２００３）中の元のＥＦ１α－ＥＧＦＰセグメントを、ウシＦｃＲｎ（ｂＦｃＲｎ）α鎖遺伝子プロモーターセグメント（２９５０ｂｐ長）とそのコード配列の人工的組合せ物と置換することによりＷＰＲＥ－Ｐ２ｂＦｃＲｎトランスファーベクターを作製した。ｂＦｃＲｎプロモーターセグメントは、ｂＦｃＲｎトランスジェニックマウスの作製に用いた（実施例２参照）ｂＦｃＲｎα鎖遺伝子を有するＢＡＣクローン＃１２８Ｅ０４を用い、Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔポリメラーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂ、ベバリー、ＭＡ、ＵＳＡ）でＰＣＲ増幅した。フォワードプライマーはＸｂａＩ部位を含み（下線）（レンチ－ＢＯＲＥ２０：５－ＧＧＧ　ＴＣＴＡＧＡ　ＡＣＡ　ＣＣＡ　ＡＧＧ　ＧＣＧ　ＧＣＡ　ＴＣＡ－３、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３９）；リバースプライマーはＥｃｏＲＩ部位を含む（レンチ－ＢＯＲＥ１８：５－ＧＧＧ　ＧＡＡＴＴＣＣＧＧ　ＣＴＣ　ＣＣＧ　ＴＧＡ　ＣＴＧ　ＧＡＧ　ＡＣ－３、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４０）。ＰＣＲにより得られたアンプリコンは、２９５０ｂｐ長のｂＦＣＧＲＴ調節配列であった（ＧｅｎＢａｎｋ：ＮＷ　００１４９３６２４．１クローン／Ｂｔ１８　ＷＧＡ２１３２　３／ボスタウラス染色体１８ゲノムコンティグ、レファレンスアッセンブリ（Ｂｔａｕ３．１に基づく）のヌクレオチド７６５４５５～７６２５１０ｂｐ）。ｂＦｃＲｎ重鎖のコードセグメントは、先に本発明者らの研究所で安定したトランスフェクト細胞を調製するのに用いた（Ｋａｃｓｋｏｖｉｃｓら、２００６ａ）ｂＦｃＲｎｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＦ１３９１０６）含有クローンからＤｅｅｐ　ＶｅｎｔポリメラーゼでｐＣＲ増幅した。フォワードプライマーはＥｃｏＲＩ部位を含み（ＢＯＲＥ１０：５－ＧＧＧ　ＧＡＡＴＴＣＴＧＧ　ＧＧＣ　ＣＧＣ　ＡＧＡ　ＧＧＧ　ＡＡＧ　Ｇ－３、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４１）；リバースプライマーはＭｌｕＩ部位を含む（レンチ－ＢＯＲＥ１９：５－ＧＧＧ　ＡＣＧＣＧＴＧＡＧ　ＧＣＡ　ＧＡＴ　ＣＡＣ　ＡＧＧ　ＡＧＧ　ＡＧＡ　ＡＡＴ－３、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４２）。ＰＣＲにより得られたアンプリコンは、１２８５ｂｐ長のｂＦｃＲｎα鎖ｃＤＮＡ（ＧｅｎＢａｎｋ：ｂＦｃＲｎのＮＭ１７６６５７レファレンス配列のヌクレオチド６４～１３４４）であった。精製後、二種のアンプリコン（ｂＦｃＲｎのコード配列とプロモーター）をＥｃｏＲＩ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で消化しＴ４リガーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で連結することにより、ｂＦｃＲｎ重鎖プロモーターの２９５０ｂｐセグメントとｂＦｃＲｎ重鎖ｃＤＮＡ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４３）の１２８５ｂｐセグメントとを有するＰ２－ｂＦｃＲｎ構築物を調製した。次いで、ｂＦｃＲｎプロモーター－ｃＤＮＡ断片をトランスファーベクタープラスミドｐＷＰＴＳに挿入した。このベクターを、先に記載した（Ｂｏｖｉａら、２００３）２９３Ｔ細胞中への一過性トランスフェクションにより増幅した。レンチウィルスを作製するために用いたベクターは、Ｔｒｏｎｏｌａｂ、Ｃａｎｔｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ（ジェノバ、スイス）から得た。次のベクターを使用した：ｐＭＤ．Ｇ（エンベロープ構築物、６ｋｂｐ）；ｐＣＭＶ　Ｒ８．９１（パッケージング構築物、１２ｋｂｐ）；ｐＷＰＴＳ（トランスファー構築物、１２．７ｋｂｐ）。ＦｃＲｎプロモーター（Ｐ２）－ＦｃＲｎｃＤＮＡ配列はＣｌａＩ、ＳａｌＩ部位間に挿入した。レンチウィルスの力価は、並行して調製したウィルスストックの上清の段階希釈物を用いたＪｕｒｋａｔ細胞に対するトランスダクションを行うことにより評価した。このウィルスはｐＷＰＲＥ－ＥＧＦＰトランスファーベクターを有していた。蛍光励起セルソーター（ＦＡＣＳ）によりＧＦＰ＋細胞をカウントした。力価はミリリットル当たり$10^7$～$10^8$トランスデューシングユニットの範囲であった。１細胞段階の接合子の囲卵腔にレンチウィルスＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎを注入することによりトランスジェニックマウスを作製した。ＦＶＢ／ＮとＢａｌｂ／ｃの遺伝的バックグラウンドにマイクロインジェクションを行った。続いて、注入後の接合子を雌性レシピエントに移植した（表６）。次のプライマー：ｂＦｃＳｕｆ　５’ＣＴＣＣＴＴＴＧＴＣＴＴＧＧＧＣＡＣＴＴ３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．９）とｂＦｃＬ５’ＧＣＧＧＣＧＧＡＴＣＣＣＴＴＣＣＣＴＣＴＧ３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１０）を用いてＰＣＲを行うことにより、トランスジェニックファウンダーを同定した。

【０２１３】

76

77

【表６】

レンチウィルス注入マウス胚のデータ

| | ＦＶＢ／Ｎ | Ｂａｌｂ／ｃ |
|---|---|---|
| 注入、移植された胚 | ３７ | ３８ |
| レシピエント雌性数 | ２ | ３ |
| 移植成功例 | ２ | １ |
| 新生児数 | １７又は１８ | ４ |
| 生存新生児数 | １３ | ４ |
| ＰＣＲ＋（トランスジェニック） | ５ | １ |

【０２１４】

トランスジーンの発現を検出するために、ＨＩＶ－Ｐ２－ＦｃＲｎ新生児マウスの腸、肺、脾臓及び肝臓から単離したＲＮＡサンプルについてＲＴ－ＰＣＲを行った（図１４に示す）。Ｐ２プロモーター用に設計したプライマー（ＦｃＲｎｐｒｆ：ＣＧＧＣＣＡＣＣＴＣＴＡＴＣＡＣＡＴＴＴ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．３；ＦｃＲｎｐｒｒ：ＴＧＣＡＴＴＧＡＣＣＡＣＡＣＴＴＧＧＴＴ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４；予想される断片サイズ：５７９ｂｐ）を用いてＲＮＡサンプル中にゲノムＤＮＡがコンタミする可能性を排除した。また、ウシＦｃＲｎエキソン４用に設計したプライマー（ｂＦｃＲｎｅｘ４ｆ：ＣＣＡＡＧＴＴＴＧＣＣＣＴＧＡＡＣＧ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１９；ｂＦｃＲｎｅｘ４ｒ：ＧＡＧＧＣＡＧＡＴＣＡＣＡＧＧＡＧＧＡＧ、ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４４、予想される断片サイズ：１６１ｂｐ）を用いてトランスジーン特異的ｍＲＮＡを検出した。結果から明らかにｂＦｃＲｎｍＲＮＡの発現が示された。

【０２１５】

トランスジェニックファウンダーをそれぞれ、野生型マウスと交配させることにより繁殖させトランスジェニック系統を確立した。

【０２１６】

実施例１１－アルブミンレベルはＴｇマウスの血清中においても上昇する

トランスジェニックマウスはｂＦｃＲｎを過剰発現していることから、次の２点：即ち（１）ｂＦｃＲｎはマウスアルブミンと相互作用するかどうか、（２）アルブミンの代謝に影響するかどうか、について検討した。従って、アルブミン特異的サンドウィッチＥＬＩＳＡを用いることにより、ＦｃＲｎを発現しないマウス（ＦｃＲｎ　ＫＯ－Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、ＵＳＡから購入）、ｗｔ動物、ホモ接合性＃１４及び＃１９（それぞれ４又は１０コピーのｂＦｃＲｎを発現）それぞれのアルブミンレベルを測定した。この研究に基づいて、ｂＦｃＲｎはアルブミンと結合しその血清レベルに大きく影響することが分かった（図１５）。更にトランスジェニックマウスの乳中のアルブミン含有量を測定したところ、その濃度が野生型コントロールよりも有意に高いことが分かった（データは示さず）。従ってこれらのデータは、体液性免疫応答に対するＦｃＲｎ過剰発現の有利な効果に加え、アルブミン濃度も上昇することを示唆するものである。アルブミン濃度の上昇により、血

78

中の浸透圧レベルが正常レベルより高くなるため害になることもあるが、コピー数が１０の場合でも認められる程度の有害な作用はなく、Ｔｇ動物は長期間健康に生存した（最長１４ヶ月間）。

【０２１７】

実施例１２－マウスＦｃＲｎ　ＫＯ－ウシＢＡＣトランスジェニックマウスにおけるウサギＩｇＧ半減期を分析するインビボ研究

ｂＦｃＲｎがウサギＩｇＧと結合し、そのクリアランスが早まらないようにするかどうかを分析するために、マウスＦｃＲｎ　ＫＯ－ウシＢＡＣトランスジェニックマウスにおけるウサギＩｇＧの半減期について分析した。４コピーの１２８Ｅ０４ＢＡＣトランスジーン（Ｂｅｎｄｅｒら、２００７）を有するｂＦｃＲｎホモ接合体マウス（＃１４）と、ノックアウトしたｍＦｃＲｎアレルのホモ接合体マウス系統とを交配させることにより、ウシＦｃＲｎトランスジェニック－マウスＦｃＲｎα鎖ヌルマウス（ｂＦｃＲｎ／ｍＦｃＲｎ$^{-/-}$）を作製した。このマウス系統は、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（ＵＳＡ）からＢ６．１２９ＸＩ－Ｆｃｇｒｔ$^{ｔｍＩＤｃｒ／Ｄｃｒ}$の名で購入した。

所望の表現型を有する二重トランスジェニックマウス（ｂＦｃＲｎ／ｍＦｃＲｎ$^{-/-}$）を、次のプライマー：ＮＥＯ－Ｆ：ＧＧＡ　ＡＴＴ　ＣＣＣ　ＡＧＴ　ＧＡＡ　ＧＧＧ　Ｃ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４５）；ＮＥＯ－Ｒ：ＣＧＡ　ＧＣＣ　ＴＧＡ　ＧＡＴ　ＴＧＴ　ＣＡＡ　ＧＴＧ　ＴＡＴ　Ｔ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４６）；ＦｃＲｎ　ｗｔ－Ｆ：ＧＧＧ　ＡＴＧ　ＣＣＡ　ＣＴＧ　ＣＣＣ　ＴＧ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４７）；ｂＦｃ　ＳｕＦ：ＣＴＣ　ＣＴＴ　ＴＧＴ　ＣＴＴ　ＧＧＧ　ＣＡＣ　ＴＴ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．９）；ｂＦｃＬ：ＧＣＣ　ＧＣＧ　ＧＡＴ　ＣＣＣ　ＴＴＣ　ＣＣＴ　ＣＴＧ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１０）を用いる多重ＰＣＲにより選択した。図１６Ａに示すように適切なＦ２マウスを同定した。

【０２１８】

本質的に実施例４に示したようにウサギＩｇＧの半減期について分析した。即ち、プレブリード後、年齢、体重及び性別（雄性）が一致したｍＦｃＲｎ$^{-/-}$とｂＦｃＲｎ$^{+/+}$／ｍＦｃＲｎ$^{-/-}$マウス（各群3匹）の腹腔内に、５０ｍｇ／ｍＬ生理食塩水溶液のウサギＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）１５０μｇ相当量を続く２１６時間でマイクロインジェクションし、定期的に血液サンプル（５０μＬ／回）を後眼窩静脈叢から回収した。捕捉試薬としてヤギ抗－ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ特異的）（Ｃａｌｔａｇ）を用い且つ検出試薬としてＨＲＰ－コンジュゲートヤギ抗－ウサギＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ特異的）（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を用いる定量的ＥＬＩＳＡにより、実験過程におけるウサギＩｇＧの血漿濃度を評価した。ＴＭＢ（３，３’，５，５’－テトラメチ

79

ルベンジジン；Ｓｉｇｍａ）を基質として用いることによりペルオキシダーゼコンジュゲート抗体を検出した。サンプルは２連でアッセイした。ウサギＩｇＧ濃度は参照標準に基づいて得られる。ＦｃＲｎ$^{-/-}$マウスではウサギＩｇＧは素早く排出されたが（半減期：１５時間）、ｂＦｃＲｎ／ＦｃＲｎ$^{-/-}$では保護されていた（半減期：６７時間）（図１６Ｂ）。ＦｃＲｎ$^{-/-}$動物における短時間でのＩｇＧクリアランスについては文献報告されており（Ｒｏｏｐｅｎｉａｎら、２００３）、またベータ－２－ミクログロブリンが存在しないことに起因して機能性ＦｃＲｎを欠く動物においても同様のことが報告されている（Ｇｈｅｔｉｅら、１９９６；Ｉｓｒａｅｌら、１９９６；Ｊｕｎｇｈａｎｓ及びＡｎｄｅｒｓｏｎ、１９９６）。本発明者らによる実験において、ｂＦｃＲｎ／ｍＦｃＲｎ$^{-/-}$動物ではｂＦｃＲｎ活性によりウサギＩｇＧのクリアランスが有意に低減された（ｐ＜０．０００１）。しかしながら、これらの動物におけるウサギＩｇＧの半減期はウサギにおけるウサギＩｇＧの半減期（半減期：１３２～１５３時間）（Ａｎｄｅｒｓｅｎ及びＢｊｏｒｎｅｂｏｅ、１９６４；Ｄｉｍａら、１９８３；Ｓａｂｉｓｔｏｎ及びＲｏｓｅ、１９７６）又はマウスにおけるウサギＩｇＧの半減期（半減期：１０６時間）（Ｄｉｍａら、１９８３）よりも遥かに短く、これはウサギＩｇＧとｂＦｃＲｎ／マウスベータ－２－ミクログロブリン複合体との相互作用が比較的弱いことを示唆している。確かにこれまでのデータにより、ＩｇＧ－ＦｃＲｎ相互作用の種間の相違は調べられているが（Ｏｂｅｒら、２００１）、このことは、ＩｇＧの半減期を向上させ延いては免疫感作時のＩｇＧレベルを向上させるためには、適切なＦｃＲｎを選択する実験が必要であることを強調するものである。

【０２１９】

実施例１３－ヒト化免疫グロブリンを産生すると共にウシＦｃＲｎを過剰発現する二重トランスジェニックウサギの、交配による作製

ヒトＩｇＧとウシＦｃＲｎを産生する二重トランスジェニックウサギ系統は、血清中の免疫グロブリンレベルを改善する候補として有望である。過剰発現されたウシＦｃＲｎのヒトＩｇＧ半減期に対する効果については既に示されているので、これらの二重トランスジェニックウサギ系統は、ポリクローナル抗血清の産生又はウサギモノクローナル抗体を産生させる出発点として非常に有用である。

【０２２０】

二重Ｔｇウサギは標準的な交配により作製することができる。先の実験により、ｂＦｃＲｎはウサギＩｇＧへの結合に関して最良の候補ではないことが示されたが、ｂＦｃＲｎトランスジェニックウサギを作製することは依然として、ヒトＩｇＧとウシＦｃＲｎの双方を産生する二重トランスジェニックウサギの作製のための望ましい

80

中間ステップとなろう。後続のステップにおいて、最終の目的とする動物を作製するために、それぞれ一方のトランスジーンを有する２種のＴｇウサギ系統の交配が行われることになる。

【０２２１】

前核マイクロインジェクションにより１２８Ｅ０４ウシＢＡＣクローンをウサギ接合体に導入し、トランスジェニックファウンダーを作製した。ウシＦＣＧＲＴ４番エキソンからの１６０ｂｐ断片の増幅用に設計したプライマー：ｂＦｃＲｎｅｘ４Ｆ：５’－ＣＣＡＡＧＴＴＴＧＣＣＣＴＧＡＡＣＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１９）とｂＦｃＲｎｅｘ４Ｒ：５’－ＧＴＧＴＧＧＧＣＡＧＧＡＧＴＡＧＡＧＧＡ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２０）を用いてＰＣＲを行い、ウシＦｃＲｎ遺伝子の有無を検出した。図１７は予想通りの断片が存在していることを示す。

【０２２２】

ファウンダーウサギのＦ１同腹子は、遺伝子的に改変されたヒト化免疫グロブリン産生ウサギとの交配に好適であり（Ｔｈｏｒｅｙら、２００６）、ヒト化ポリクローナル抗体産生の向上したレベルを達成するのに適した二重トランスジェニック動物を与える。

【０２２３】

実施例１４－ヒト化免疫グロブリンを産生すると共にウシＦｃＲｎを過剰発現する二重トランスジェニックウサギの作製

実施例１３の別法として、ヒト化免疫グロブリン産生トランスジェニックウサギをレシピエント動物として用いて（Ｔｈｏｒｅｙら、２００６）実施例３の記載と同様にトランスジェネシス実験を行うことにより、二重トランスジェニックウサギ系統を作製することができる。１２８Ｅ０４ウシＢＡＣクローンを用いて、前核マイクロインジェクションによりトランスジェニックウサギを作製した。トランスジェニックウサギは、ウシＢＡＣクローン特異的なプローブとプライマーを用いるＰＣＲ及び／又はサザンブロットにより同定し、注入されたヒトＩｇＧの半減期について評価した。ウサギ血清中において半減期は実質的により長くなり、これは導入されたウシＦｃＲｎが、トランスジェニックウサギにより産生されたヒト免疫グロブリンを分解から保護していることを示している。

【０２２４】

実施例１５－ウサギＦｃＲｎα鎖遺伝子を有するＢＡＣクローン単離及び特性化

ＦｃＲｎ活性に関する初期の研究の多くはモデル動物としてウサギを用いていたため、ウサギＦｃＲｎは各組織の内皮細胞によって発現され、ＩｇＧの恒常性に寄与することが予測された。従って、ウサギＦｃＲｎ遺伝子コピーを追加することでＩｇＧ半減期は向上する。よって、ウサギＦｃＲｎをクローン化しその配列を決定した（

81

ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４８）。

【０２２５】

これと並行して、ウサギＢＡＣライブラリーから（Ｒｏｇｅｌ－Ｇａｉｌｌａｒｄら、２００１）ウサギＢＡＣクローン２６２Ｅ０２を単離した。このＢＡＣライブラリーはｐＢｅｌｏＢＡＣ１１ベクター中に構築されたものであり、この高分子量ＤＮＡはニュージーランドウサギの白血球細胞から調製された。ウサギＢＡＣライブラリーは、家畜のためのＩＮＲＡリソースセンターにより取扱われており公的に入手可能である。ウサギＦＣＧＲＴ遺伝子特異的プライマー：ＯＣＵＦＣＧＲＴＦ：ＧＧＧＡＣＴＣＣＣＴＣＣＴＴＣＴＴＴＧＴ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４９）とＯＣＵＦＣＧＲＴＲ：ＡＧＣＡＣＴＴＣＧＡＧＡＧＣＴＴＣＣＡＧ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５０）をＰｒｉｍｅｒ　３プログラム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｇｅｎｏｐｏｌｅ－ｔｏｕｌｏｕｓｅ．ｐｒｄ．ｆｒ／ｉｃｃａｒｅ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｐｒｉｍｅｒ３ａＴｇ．ｃｇｉ．ｐｌ）で設計し、Ｉｃｃａｒｅプログラム（ｈｔｔｐ：／／ｂｉｏｉｎｆｏ．ｇｅｎｏｐｏｌｅ－ｔｏｕｌｏｕｓｅ．ｐｒｄ．ｆｒ／Ｉｃｃａｒｅ／）でこれをヒトＦＣＧＲＴ遺伝子（ＧｅｎＢａｎｋ　ＮＭ００４１０７）とアラインメントさせることによりウサギの発現配列タグ（ＥＳＴ）ＥＢ３７７７７５を同定した。ＥＢ３７７７７５ＥＳＴ配列はウサギＦｃＲｎｃＤＮＡ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５５）の対応部分と同一である。オーソロガスボスタウラス染色体に基づいて、２６２Ｅ０２ウサギＢＡＣクローンを候補遺伝子の有無について分析した。Ｏｒｙｃｔｏｌａｇｕｓ　ｃｕｎｉｃｕｌｕｓのＥＳＴ用に設計したプライマーとウシ遺伝子特異的プライマーのいずれか一方をＦＣＧＲＴ遺伝子近傍の５０ｋｂ内の５’及び３’方向に用いた。次のウサギ遺伝子が２６２Ｅ０２ＢＡＣクローンに同定された：ＲＰＬ１３Ａ；ＲＰＳ１１；ＦＣＧＲＴ；ＲＣＮ３；ＰＲＲＧ２（図１８参照）。

【０２２６】

【表7】

82

ウサギＢＡＣクローン２６２Ｅ０２におけるオーソロガスウシ遺伝子の有無を評価するためのプライマー及びＰＣＲ条件

| 推定遺伝子 | プライマー | Ｔｍ（℃） | 産物（ｂｐ） |
|---|---|---|---|
| ＰＲＲＧ | ＰＲＲＧ２＿Ｌ：<br>５’－ＧＴＴＧＴＴＣＡＣＡＣＣＡＧＧＧＡＡＣＣ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２５）<br>ＰＲＲＧ２＿Ｒ：<br>５’－ＣＣＴＴＴＧＣＣＡＴＴＧＴＡＧＡＴＧＴＡＧＣ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．２６） | ６１ | ２９５ |
| ＲＣＮ３ | ＲＣＮ３＿Ｌ：<br>５’－ＧＡＣＧＣＣＧＡＧＡＣＣＴＡＣＡＡＧＡＡ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５１）<br>ＲＣＮ３＿Ｒ：<br>５’－ＣＡＴＧＴＧＣＧＧＧＡＡＣＴＣＣＴＣ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５２） | ６１ | １６８ |
| ＦＣＧＲＴ | ＦＣＧＲＴ＿Ｌ：<br>５’－ＣＴＧＡＡＣＧＧＴＧＡＧＧＡＣＴＴＣＡＴ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５３）<br>ＦＣＧＲＴ＿Ｒ：<br>５’－ＧＣＴＣＣＴＴＣＣＡＣＴＣＣＡＧＧＴＴ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５４） | ６１ | ２１０ |
| ＲＰＳ１１ | ＲＰＳ１１＿Ｌ：<br>５’－ＡＧＡＴＣＧＧＣＧＡＣＡＴＣＧＴＣＡ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５５）<br>ＲＰＳ１１＿Ｒ：<br>５’－ＴＣＴＧＧＡＡＣＴＧＣＴＴＣＴＴＧＧＴＧ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５６） | ６１ | １０８ |
| ＲＰＬ１３Ａ | ＲＰＬ１３Ａ＿Ｌ：<br>５’－ＣＡＴＧＡＧＧＴＧＧＧＣＴＧＧＡＡＧＴＡ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５７）<br>ＲＰＬ１３Ａ＿Ｒ：<br>５’－ＴＣＣＧＧＴＡＧＴＧＧＡＴＣＴＴＡＧＣＣ－３’<br>（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．５８） | ６１ | ８２ |

【０２２７】

また、スロット－ブロット分析に基づきＦＬＴ３ＬＧ遺伝子の存在も検出した。プライマー：ＦＬＴ３ＬＧＬ：５’－ＴＣＧＧＡＧＡＴＧＧＡＧＡＡＡＣＴＧＣＴ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１５）とＦＬＴ３ＬＧＲ：５’－ＣＴＧＧＡＣＧＡＡＧＣＧＡＡＧＡＣＡＧ－３’（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．１６）を用いて得られたウシＦＬＴ３ＬＧ５４７ｂｐＰＣＲ産物を２６２Ｅ０２ウサギＢＡＣとハイブリダイズさせたところ、高度にストリンジェントな条件下で強い陽性シグナルが得られた。

【０２２８】

ウサギＢＡＣクローン２６２Ｅ０２の構造は、ウシ１２８Ｅ０４ウシＢＡＣクローンと極めて類似していると考えられ、従ってトランスジェネシス実験においても同様に良好な結果をもたらすと期待できる。

【０２２９】

実施例１６－ウサギＦｃＲｎを過剰発現するトランスジェニックウサギの作製とウサギＩｇＧの半減期を分析するインビボ研究

これまでの実施例で特性評価されたウサギＢＡＣクローン２６２Ｅ０２を有する遺伝子構築物か又は十分に特性評価されたｂＦｃＲｎプロモーターによって駆動されるウサギＦｃＲｎｃＤＮＡ（ＳＥＱ．ＩＤ．ＮＯ．４８）を含み、ウサギＦｃＲｎｃＤＮＡの下流にヘテロガスイントロンと市販のＳＶ４０ポリＡ領域を更に含む構築物を、前核マイクロインジェクションでウサギ接合体に導入した。或いは、トランスジェニックウサギは、実施例１０に記載のレンチウィルストランスファーベクターにＰ２－ウサギＦｃＲｎｃＤＮＡ構築物を挿入して、これをウサギ胚の囲卵腔に注入することにより作製すること

もできる。トランスジェニックウサギは、特異的プライマー／プローブを用いるＰＣＲ及び／又はサザンブロットにより同定される。ウサギＦｃＲｎを過剰発現するトランスジェニックウサギにおけるＩｇＧ半減期は、例えば上で例示したような標準的な方法で評価される。

【０２３０】

以上から、ウサギＦｃＲｎα鎖を過剰発現するトランスジェニックウサギはポリクローナル抗血清の産生向上に有利に用いることができる。

【０２３１】

参考文献


Abbas A. K. and Lichtman A. H. (2003) Cellular and molecular immunology. WB Saunders Co, Philadelphia.

Adamski F. M., King A. T. and Demmer J. (2000) Expression of the Fc receptor inthe mammary gland during lactation in the marsupial Trichosurus vulpecula (brushtail possum). Mol Immunol 37, 435−44.

Ahouse J. J., Hagerman C. L., Mittal P., Gilbert D. J., Copeland N. G., JenkinsN. A. and Simister N. E. (1993) Mouse MHC class I−like Fc receptor encoded outside the MHC. J Immunol 151, 6076−88.

Akilesh S., Christianson G. J., Roopenian D. C. and Shaw A. S. (2007) Neonatal FcR Expression in Bone Marrow−Derived Cells Functions to Protect Serum IgG from Catabolism. J Immunol 179, 4580−8.

Andersen J. T., Dee Qian J. and SandlieI. (2006) The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptorheavy chain is critical for the pH−dependent binding to albumin. Eur J Immunol 36, 3044−51.

Andersen S. B. and Bjorneboe M. (1964) Gamma Globulin Turnover in Rabbits before and During Hyperimmunization. J Exp Med 119, 537−46.

Anderson C. L., Chaudhury C., Kim J., Bronson C. L., Wani M. A. and Mohanty S. (2006) Perspective − FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. Trends Immunol 27, 343−8.

Antohe F., Radulescu L., Gafencu A., Ghetie V. and Simionescu M. (2001) Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells. Hum Immunol 62, 93−105.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1998) Current protocolsin Molecular Biology. John Wiley & Sons., Hoboken, NJ, USA.

Beers M. H. and Berkow R. (1999) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. Merck Research Laboratories, New York, N. J.

Bender B., Bodrogi L., Mayer B., Schneider Z., Zhao Y., Hammarstrom L., Eggen A., Kacskovics I. and Bosze Z. (2007) Position independent and copy−number−related expression of the bovine neonatal Fc receptor alpha−chain in transgenic mice carrying a 102 kb BAC genomic fragment. Transgenic Res 16, 613−27.

Bender B., Bodrogi L., Ya

85

ofeng Z., Kacskovics I., Hammarstrom L. and Boesze Z. (2004) Generation of bovine FcRn alpha chain BAC transgenic mice. Tissue Antigens 64, 374−375.

Borvak J., Richardson J., Medesan C., Antohe F., Radu C., Simionescu M., GhetieV. and Ward E. S. (1998) Functional expression of the MHC class I−related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. Int Immunol 10, 1289−98.

Bovia F., Salmon P., Matthes T., Kvell K., Nguyen T. H., Werner−Favre C., Barnet M., Nagy M., Leuba F., Arrighi J. F., Piguet V., Trono D. and Zubler R. H. (2003) Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV−1−derived lentiviral vectors. Blood 101, 1727−33.

Brambell F. W. R. (1958) The passive immunity of the young mammal. Biological Reviews 33, 488−531.

Brambell F. W. R., Hemmings W. A. and Morris I. G. (1964) A theoretical model of gammaglobulin catabolism. Nature 203, 1352−1355.

Butler J. E. (2006) Why I agreed to do this. Dev Comp Immunol 30, 1−17.

Chaudhury C., Brooks C. L., Carter D. C., Robinson J. M. and Anderson C. L. (2006) Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn−IgG interaction. Biochemistry 45, 4983−90.

Chaudhury C., Mehnaz S., Robinson J. M., Hayton W.

86

L., Pearl D. K., Roopenian D. C. and Anderson C. L. (2003) The MajorHistocompatibility Complex−related Fc Receptor for IgG (FcRn) Binds Albumin andProlongs Its Lifespan. The Journal of Experimental Medicine 197, 315−322.

Cibelli J. B., Stice S. L., Golueke P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F. A. and Robl J. M. (1998) Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell−derived stem−like cells. Nat Biotechnol 16, 642−6.

Claypool S. M., Dickinson B. L., WagnerJ. S., Johansen F. E., Venu N., Borawski J. A., Lencer W. I. and Blumberg R. S. (2004) Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fcgamma−receptor. Mol Biol Cell 15, 1746−59.

Cowan P. J., Tsang D., Pedic C. M., Abbott L. R., Shinkel T. A., d'Apice A. J. and Pearse M. J. (1998) The human ICAM−2promoter is endothelial cell−specific in vitro and in vivo and contains critical Sp1 and GATA binding sites. J Biol Chem 273, 11737−44.

Dickinson B. L., Badizadegan K., Wu Z., Ahouse J. C., Zhu X., Simister N. E., Blumberg R. S. and Lencer W. I. (1999) Bidirectional FcRn−dependent IgG transportin a polarized human intestinal epithelial cell line. J Clin Invest

87

104, 903−11.
Dima S., Medesan C., Mota G., Moraru I., Sjoquist J. and Ghetie V. (1983) Effect of protein A and its fragment B on thecatabolic and Fc receptor sites of IgG. Eur J Immunol 13, 605−14.
Dobie K. W., Lee M., Fantes J. A., Graham E., Clark A. J., Springbett A., LatheR. and McClenaghan M. (1996) Variegatedtransgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 6659−64.
Eggen A., Gautier M., Bilaut A., PetitE., Hayes H., Laurent P., Urban C., Pfister−Genskow M., Eilertsen K. and BishopM. D. (2001) Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome−equivalent coverage. Genet Sel Evol 33, 543−8.
Emanuel S. L. and Pestka S. (1993) Amplification of specific gene products fromhuman serum. Genet Anal Tech Appl 10, 144−6.
Ghetie V., Hubbard J. G., Kim J. K., Tsen M. F., Lee Y. and Ward E. S. (1996) Abnormally short serum half−lives of IgG in beta 2−microglobulin−deficient mice. Eur J Immunol 26, 690−6.
Ghetie V. and Ward E. S. (2002) Transcytosis and catabolism of antibody. Immunol Res 25, 97−113.
Giraldo P. and Montoliu L. (2001) Size matters: use of YACs, BACs and PACs

88

in transgenic animals. Transgenic Res 10, 83−103.
Guyton A. C. (1991) Textbook of MedicalPhysiology. W. B. Saunders Company.
Hao Y. H., Yong H. Y., Murphy C. N., Wax D., Samuel M., Rieke A., Lai L., Liu Z., Durtschi D. C., Welbern V. R., Price E. M., McAllister R. M., Turk J. R., Laughlin M. H., Prather R. S. and Rucker E. B. (2006) Production of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) over−expressing piglets. Transgenic Res.
Harmsen M. M., Van Solt C. B., Fijten H. P. and Van Setten M. C. (2005) Prolonged in vivo residence times of llama single−domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. Vaccine 23, 4926−34.
Hayes H., Petit E., Lemieux N. and Dutrillaux B. (1992) Chromosomal localization of the ovine beta−casein gene by non−isotopic in situ hybridization and R−banding. Cytogenet Cell Genet 61, 286−8.
Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhauve M., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. EMBO Rep 4, 1054−60.
Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2004) Generation of transgenic cattle by lentivi

89

ral gene transfer into oocytes. Biol Reprod 71, 405−9.

Israel E. J., Patel V. K., Taylor S. F., Marshak−Rothstein A. and Simister N. E. (1995) Requirement for a beta 2−microglobulin−associated Fc receptor for acquisition of maternal IgG by fetal and neonatal mice. J Immunol 154, 6246−51.

Israel E. J., Wilsker D. F., Hayes K. C., Schoenfeld D. and Simister N. E. (1996) Increased clearance of IgG in mice that lack beta 2−microglobulin: possible protective role of FcRn. Immunology 89, 573−8.

Janeway Jr. C. A., Travers P., Walport M. and Shlomchik M. J. (2001) Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Publishing, New York, NY.

Junghans R. P. (1997) Finally! The Brambell receptor (FcRB). Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. Immunol Res 16, 29−57.

Junghans R. P. and Anderson C. L. (1996) The protection receptor for IgG catabolism is the beta2−microglobulin−containing neonatal intestinal transport receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5512−6.

Jurka J., Kapitonov V. V., Pavlicek A., Klonowski P., Kohany O. and Walichiewicz J. (2005) Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements

90

. Cytogenet Genome Res 110, 462−7.

Kacskovics I., Kis Z., Mayer B., West A. P., Jr., Tiangco N. E., Tilahun M., Cervenak L., Bjorkman P. J., Goldsby R. A., Szenci O. and Hammarstrom L. (2006a) FcRn mediates elongated serum half−life of human IgG in cattle. Int Immunol 18, 525−36.

Kacskovics I., Mayer B., Kis Z., FrenyoL. V., Zhao Y., Muyldermans S. and Hammarstrom L. (2006b) Cloning and characterization of the dromedary (Camelus dromedarius) neonatal Fc receptor (drFcRn). Dev Comp Immunol 30, 1203−15.

Kacskovics I., Wu Z., Simister N. E., Frenyo L. V. and Hammarstrom L. (2000) Cloning and characterization of the bovineMHC class I−like Fc receptor. J Immunol164, 1889−97.

Karlsson R., Michaelsson A. and Mattsson L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody−antigen interactions with a new biosensor based analytical system. JImmunol Methods 145, 229−40.

Kobayashi N., Suzuki Y., Tsuge T., Okumura K., Ra C. and Tomino Y. (2002) FcRn−mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 282, F358−65.

Kohler G. and Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256,

91

495−7.
Leenaars M. and Hendriksen C. F. (2005) Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. Ilar J 46, 269−79.
Lin Z. and Floros J. (2000) Protocol for genomic DNA preparation from fresh or frozen serum for PCR amplification. Biotechniques 29, 460−2, 464, 466.
Lipman N. S., Jackson L. R., Trudel L. J. and Weis−Garcia F. (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. Ilar J 46, 258−68.
Lobo E. D., Hansen R. J. and Balthasar J. P. (2004) Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. J Pharm Sci 93, 2645−68.
Lois C., Hong E. J., Pease S., Brown E. J. and Baltimore D. (2002) Germline transmission and tissue−specific expressionof transgenes delivered by lentiviral vectors. Science 295, 868−72.
Lonberg N. (2005) Human antibodies fromtransgenic animals. Nat Biotechnol 23, 1117−25.
Lu W., Zhao Z., Zhao Y., Hammarstroem L. and Li N. (2006) Over−expression of the bovine neonatal Fc receptor gene in the mammary gland of transgenic mice. In 8th World Congress on Genetics Applied toLivestock Production, Belo Horizonte, MG, Brasil.
Lu W., Zhao Z., Zhao Y.,

92

Yu S., Zhao Y., Fan B., Kacskovics I., Hammarstrom L. and Li N. (2007) Over−expression of the bovine FcRn in the mammary gland resultsin increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice. Immunology 122, 401−8.
Maletto B. A., Ropolo A. S., Alignani D. O., Liscovsky M. V., Ranocchia R. P., Moron V. G. and Pistoresi−Palencia M. C. (2006) Presence of neutrophil−bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. Blood 108, 3094−102.
Manz R. A., Hauser A. E., Hiepe F. and Radbruch A. (2005) Maintenance of serum antibody levels. Annu Rev Immunol 23, 367−86.
Mayer B., Kis Z., Kajan G., Frenyo L. V., Hammarstrom L. and Kacskovics I. (2004) The neonatal Fc receptor (FcRn) is expressed in the bovine lung. Vet Immunol Immunopathol 98, 85−9.
Mayer B., Zolnai A., Frenyo L. V., Jancsik V., Szentirmay Z., Hammarstrom L. and Kacskovics I. (2002) Redistribution ofthe sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. Immunology 107, 288−96.
McCarthy K. M., Yoong Y. and Simister N. E. (2000) Bidirectional transcytosis of IgG by the rat neonatal Fc receptor expressed in a rat kidney cell line: a system to study pro

93

tein transport across epithelia. J Cell Sci 113, 1277−85.

McCullough K. C. and Summerfield A. (2005) Basic concepts of immune response and defense development. Ilar J 46, 230−40.

McGrew M. J., Sherman A., Ellard F. M., Lillico S. G., Gilhooley H. J., Kingsman A. J., Mitrophanous K. A. and Sang H. (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Rep 5, 728−33.

Mond J. J., Lees A. and Snapper C. M. (1995) T cell−independent antigens type 2. Annu Rev Immunol 13, 655−92.

Ober R. J., Martinez C., Lai X., Zhou J. and Ward E. S. (2004) Exocytosis of IgG as mediated by the receptor, FcRn: an analysis at the single−molecule level. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 11076−81.

Ober R. J., Radu C. G., Ghetie V. and Ward E. S. (2001) Differences in promiscuity for antibody−FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. Int Immunol 13, 1551−9.

Opsahl M. L., Springbett A., Lathe R., Colman A., McClenaghan M. and Whitelaw C. B. (2003) Mono−allelic expression of variegating transgene locus in the mouse. Transgenic Res 12, 661−9.

Palmiter R. D., Wilkie T. M., Chen H. Y. and Brinster R. L. (1984) Transmissiondistortion and mosaic

94

ism in an unusual transgenic mouse pedigree. Cell 36, 869−77.

Peterson N. C. (2005) Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. Ilar J 46, 314−9.

Petkova S. B., Akilesh S., Sproule T. J., Christianson G. J., Al Khabbaz H., Brown A. C., Presta L. G., Meng Y. G. and Roopenian D. C. (2006) Enhanced half−life of genetically engineered human IgG1 antibodies in a humanized FcRn mouse model: potential application in humorally mediated autoimmune disease. Int Immunol 18, 1759−69.

Pfeifer A. (2006) Lentiviral transgenesis−−a versatile tool for basic research and gene therapy. Curr Gene Ther 6, 535−42.

Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y. and VermaI. M. (2002) Transgenesis by lentiviralvectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci U S A99, 2140−5.

Popov S., Hubbard J. G., Kim J., Ober B., Ghetie V. and Ward E. S. (1996) The stoichiometry and affinity of the interaction of murine Fc fragments with the MHCclass I−related receptor, FcRn. Mol Immunol 33, 521−30.

Raguz S., Hobbs C., Yague E., Ioannou P. A., Walsh F. S. and Antoniou M. (1998) Muscle−specific locus

95

control region activity associated with the human desmin gene. Dev Biol 201, 26−42.

Rodewald R. (1976) pH−dependent bindingof immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. J Cell Biol 71, 666−9.

Rogel−Gaillard C., Piumi F., Billault A., Bourgeaux N., Save J. C., Urien C., Salmon J. and Chardon P. (2001) Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q. 1. 1. Mamm Genome 12, 253−5.

Roopenian D. C. and Akilesh S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol 7, 715−25.

Roopenian D. C., Christianson G. J., Sproule T. J., Brown A. C., Akilesh S., Jung N., Petkova S., Avanessian L., Choi E. Y., Shaffer D. J., Eden P. A. and Anderson C. L. (2003) The MHC class I−like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG−Fc−coupled drugs. J Immunol 170, 3528−33.

Sabiston B. H. and Rose J. E. (1976) Effect of cold exposure on the metabolism of immunoglobulins in rabbits. J Immunol116, 106−11.

Sachs U. J., Socher I., Braeunlich C. G., Kroll H., Bein G. and Santoso S. (2006) A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha−chain promoter. Immunology 119, 83−9.

Sandford A. J. and Pare P. D. (1997) Direct PCR of small genomic DNA fragments from serum. Biotechniques 23, 890−2.

Schedl A., Grimes B. and Montoliu L. (1996) YAC transfer by microinjection. Methods Mol Biol 54, 293−306.

Schnulle P. M. and Hurley W. L. (2003) Sequence and expression of the FcRn in the porcine mammary gland. Vet Immunol Immunopathol 91, 227−31.

Schunk M. K. and Macallum G. E. (2005) Applications and optimization of immunization procedures. Ilar J 46, 241−57.

Simister N. E. and Mostov K. E. (1989) An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. Nature 337, 184−7.

Simister N. E. and Rees A. R. (1985) Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine. Eur J Immunol 15, 733−8.

Smit A., Hubley R. and Green P. (1996−2004) Repeat Masker Open−3. 0.

Spiekermann G. M., Finn P. W., Ward E. S., Dumont J., Dickinson B. L., BlumbergR. S. and Lencer W. I. (2002) Receptor−mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. J Ex

96

97

p Med 196, 303−10.
Stills H. F., Jr. (2005) Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. Ilar J 46, 280−93.
Stirling C. M., Charleston B., Takamatsu H., Claypool S., Lencer W., Blumberg R. S. and Wileman T. E. (2005) Characterization of the porcine neonatal Fc receptor−−potential use for trans−epithelial protein delivery. Immunology 114, 542−53.
Story C. M., Mikulska J. E. and Simister N. E. (1994) A major histocompatibility complex class I−like Fc receptor cloned from human placenta: possible role in transfer of immunoglobulin G from mother to fetus. J Exp Med 180, 2377−81.
Sutherland H. G., Kearns M., Morgan H. D., Headley A. P., Morris C., Martin D. I. and Whitelaw E. (2000) Reactivation of heritably silenced gene expression in mice. Mamm Genome 11, 347−55.
Tesson L., Heslan J. M., Menoret S. andAnegon I. (2002) Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real−time quantitative PCR. Transgenic Res 11, 43−8.
Thorey I., Offner S., Ros F., Schueler N., Siewe B., Niersbach H., Buelow R., van Schooten W. and Platzer J. (2006) Expression of a humanized antibody

98

repertoire in transgenic rabbits. In International Congress of Immunogenomics and Immunomics, Budapest, Hungary.
Vidarsson G., Stemerding A. M., Stapleton N. M., Spliethoff S. E., Janssen H., Rebers F. E., de Haas M. and van de Winkel J. G. (2006) FcRn: an IgG receptor onphagocytes with a novel role in phagocytosis. Blood 108, 3573−9.
Wakayama T., Perry A. C., Zuccotti M., Johnson K. R. and Yanagimachi R. (1998) Full−term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cellnuclei. Nature 394, 369−74.
Whitelaw C. B., Radcliffe P. A., Ritchie W. A., Carlisle A., Ellard F. M., PenaR. N., Rowe J., Clark A. J., King T. J. and Mitrophanous K. A. (2004) Efficientgeneration of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. FEBS Lett 571, 233−6.
Yoshida M., Kobayashi K., Kuo T. T., Bry L., Glickman J. N., Claypool S. M., Kaser A., Nagaishi T., Higgins D. E., Mizoguchi E., Wakatsuki Y., Roopenian D. C., Mizoguchi A., Lencer W. I. and BlumbergR. S. (2006) Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses toluminal bacteria. J Clin Invest 116, 2142−2151.
Zhao Y., Kacskovics I., Zhao Z. and Hammarstrom L. (2003) Presence of the di−leucine motif in the cy

99

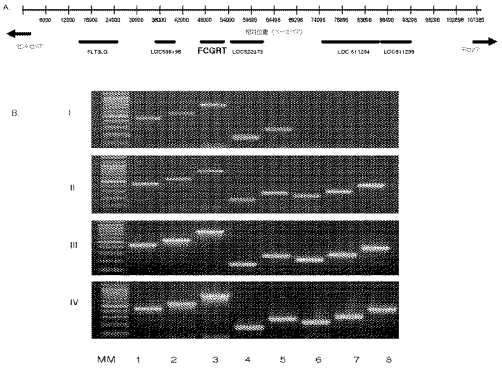
toplasmic tail of the pig FcRn alpha chain. Vet Immunol Immunopathol 96, 229-33.

Zhu X., Meng G., Dickinson B. L., Li X., Mizoguchi E., Miao L., Wang Y., RobertC., Wu B., Smith P. D

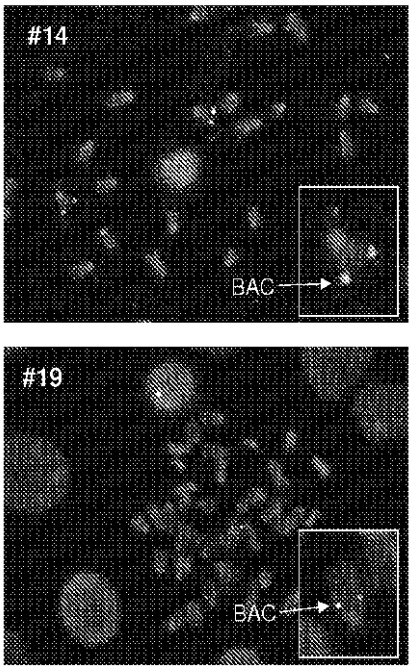
100

., Lencer W. I. and Blumberg R. S. (2001) MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. J Immunol 166, 3266-76.

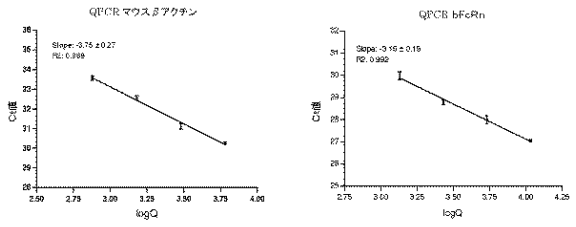
【図1】



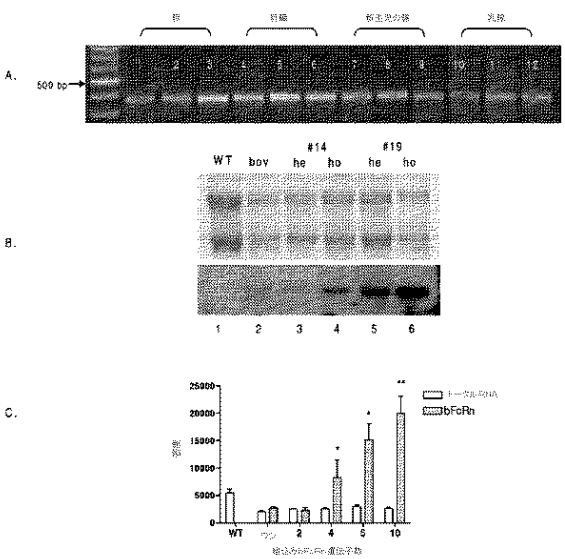

【図2】



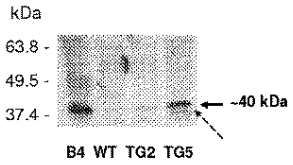

【図3】



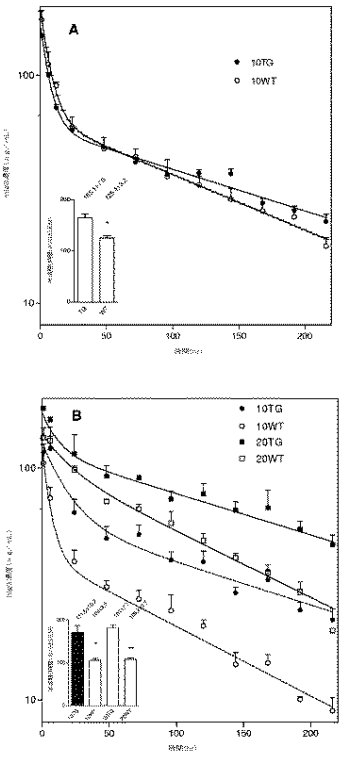

【図4】



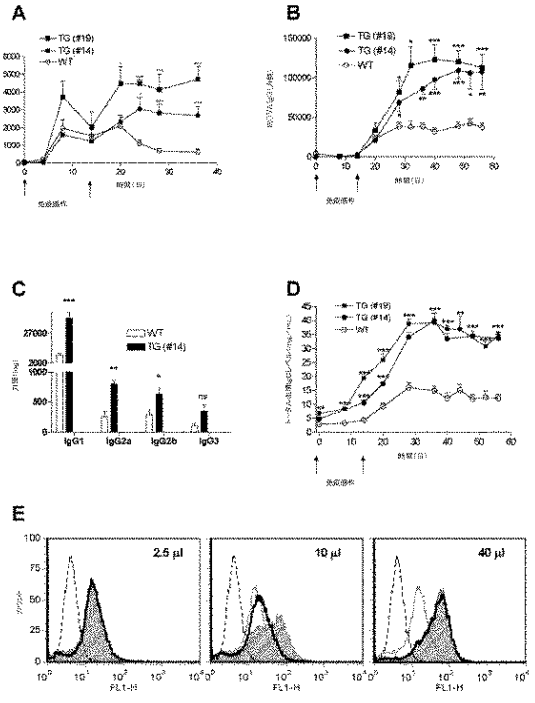

【図5】



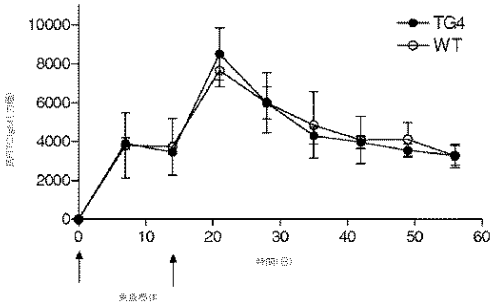
【図６】



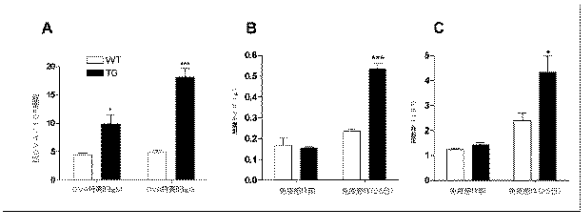

【図７】



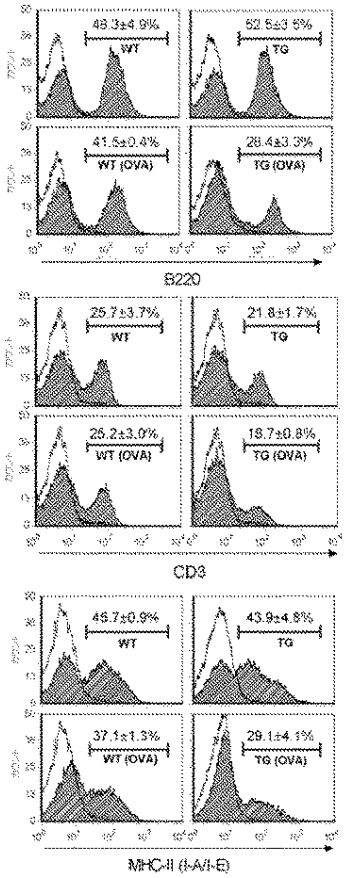

【図８】



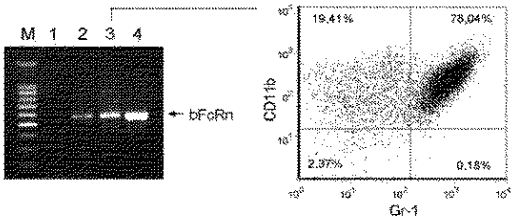

【図９】



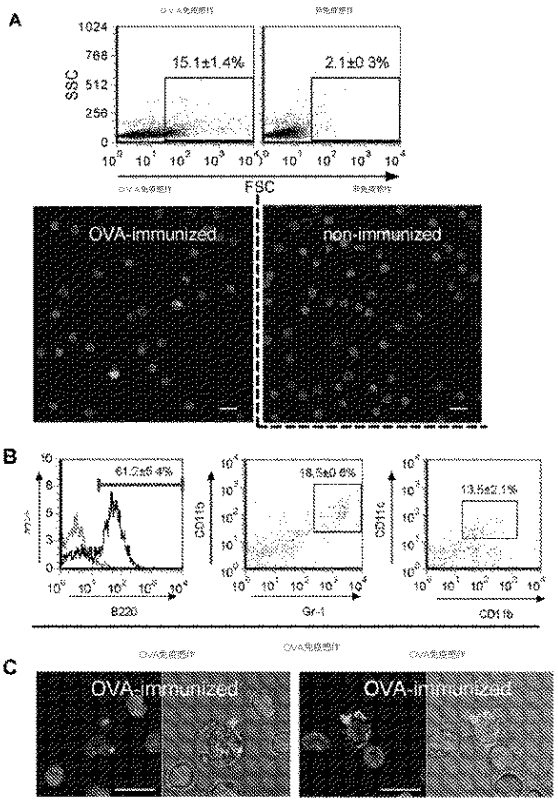

【図１０】



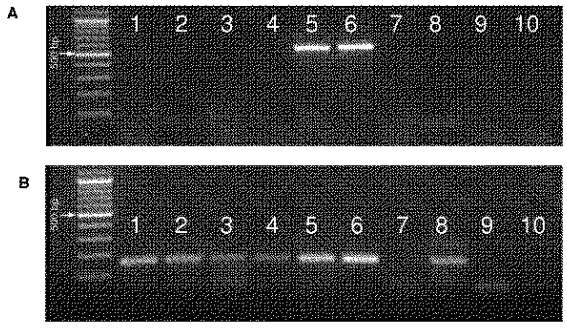
【図１２】



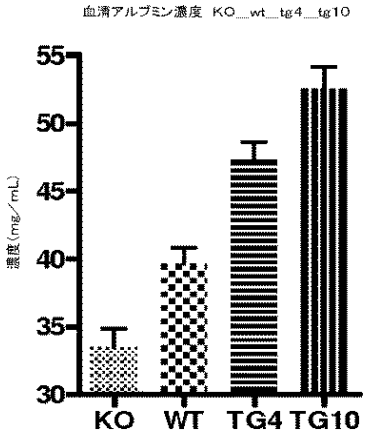

【図１３】



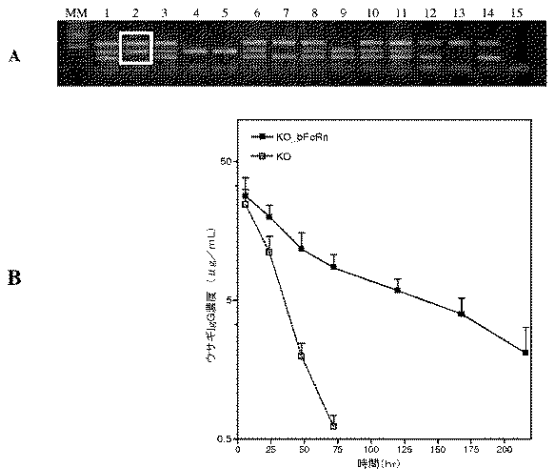

【図１４】



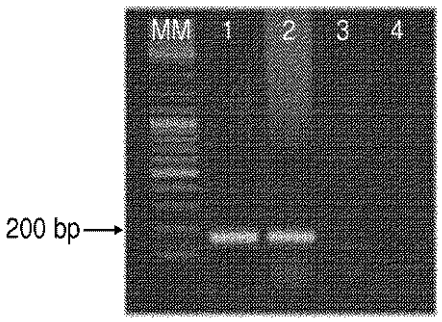

【図１５】



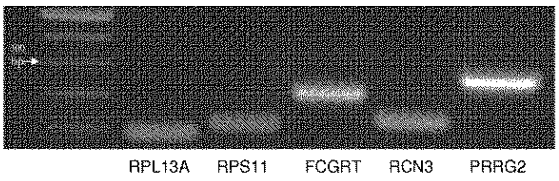

【図１６】



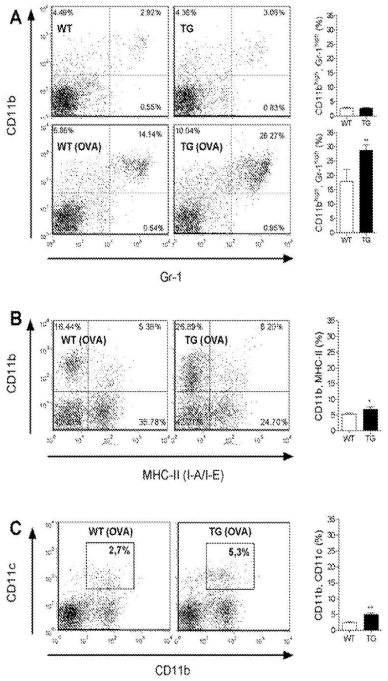

【図１７】




【図１８】



【図１１】



【配列表】
0005752355000001.app

フロントページの続き

早期審理対象出願

(72)発明者　ジュジャンナ・ボーツェ
ハンガリー国　Ｈ－２１００　ゲデレー　イボヤ　ウッツァ．　６３．　エフエスゼット．２．
(72)発明者　イムレ・カーチュコヴィッチ
ハンガリー国　Ｈ－２０９２　ブダケシ　フノル　ウッツァ．　２０／ａ．
(72)発明者　ユディット・サーベナック
ハンガリー国　Ｈ－２０９２　ブダケシ　サナトリウム　ウッツァ．　１６．
(72)発明者　ラスロ・ヒリピ
ハンガリー国　Ｈ－２１００　ゲデレー　バラトン　ウッツァ．　１１．
(72)発明者　バラージュ・ベンダー
ハンガリー国　Ｈ－３０７８　バトニテレニュ　ダミヤニチ　ウッツァ．　２．

合議体
審判長　鈴木　恵理子
審判官　飯室　里美
審判官　高堀　栄二

(56)参考文献　特開平３－１７３８９９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０８７８１１（WO，Ａ２）
２ｎｄ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｖｅｔｅｒｉｎａｒｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｗｏｒｋｓｈｏｐ　：　Ｐｒｏｇｒａｍ　ａｎｄ　Ｂｏｏｌ　ｏｆ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ、２００６．９、ｐ．４７、ＰＳ３－０４
ＦＥＢＳ　Ｊｏｕｒｎａｌ、２００５、Ｖｏｌ．２７２、Ｎｏ．Ｓｕｐｐｌ．１、ｐ．２８８

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N15/00
A01K67/027
ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）